

Molekularbiologische Untersuchungen der Funktion und Regulation des Neurotrophin-Rezeptors p75^{NGFR} in Muskelzellen

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von
Christian Erck
aus
Wolfsburg

1. Referent: Prof. Dr. H.-H. Arnold

2. Referent: Prof. Dr. J. Wehland

eingereicht am: 10.97

mündliche Prüfung am: 13.03.98

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Naturwissenschaftlichen Fakultät in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

1. Seidl, K., Erck, C., and Buchberger, A. (1998). Evidence for the Participation of Nerve Growth Factor and its Low-Affinity Receptor (p75^{NTR}) in the Regulation of the myogenic Program. *Journal of Cellular Physiology* 176: in press
2. Erck, C., Meisinger, C., Grothe, C., and Seidl, K. (1998). Regulation of Nerve Growth Factor and its Low-Affinity Receptor (p75^{NTR}) during myogenic Differentiation.. *Journal of Cellular Physiology* 176: in press
3. Erck, C., and Seidl, K. (1998) MyoD and MEF2A mediate activation and repression of the p75^{NGFR} gene during muscle development. *Biochemical and Biophysical Research Communication* in press

Tagungsbeiträge

1. Erck, C. and Seidl, K. (1996). Expression and regulation of neurotrophins and their receptors during myogenic differentiation of C2C12 cells. 15. European Muscle Congress. EMC.
2. Erck, C., Seidl, K. (1997). MyoD-responsive element(s) in the 5'-region of the fast nerve growth factor receptor (p75^{NGFR}). 21. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie. *European Journal of Cell Biology*.
3. Seidl, K., Erck, C. (1997). The ambiguity of muscle-derived neurotrophins: myogenic roles. 21. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie. *European Journal of Cell Biology*.

Danken möchte ich...

...allgemein allen Mitarbeitern der Abteilung für Zell- und Molekularbiologie des Instituts für Biochemie und Biotechnologie der Technischen Universität Braunschweig.

...der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung.

...Herrn Prof. Dr. Hans-Hennig Arnold für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes und seine wertvolle Kritik.

...meinem Betreuer Herrn Dr. Klaus Seidl für die Überlassung des Themas, für seine liberale Betreuung, ständige Diskussionsbereitschaft und seinen Einsatz bei der Veröffentlichung der Ergebnisse dieser Arbeit.

...Frau Prof. Dr. Claudia Grothe und dem Doktoranden Christoph Meisinger für die Zusammenarbeit bei der Untersuchung des FGFR1 und des FGF-2-Proteins in den Zelllinien C2C12 und L6.

...Herrn Heiko Meents für die Zusammenarbeit bei der Transfektion der MEF-2A stabilexprimierenden C3H10T1/2-Zelllinie.

...Herrn Dr. Thomas Braun für sein Einfühlungsvermögen bei schwierigen Fragestellungen und seine überaus kompetenten Anregungen.

...Frau Dr. Astrid Buchberger für die Unterstützung bei molekularbiologischen Fragestellungen.

...Frau Dr. Sandmöller für die Diskussionen über das E1A-Protein.

...Frau Charlotte Klaue für ihren unermüdlichen Einsatz in organisatorischen Fragen und ihre Fürsorglichkeit.

...Frau Leonore Wesemann für die hochgeschätzte lor'sche Materialorganisation und den Superschmelz.

...dem „Mensa-Team“ Thomas Floß, André Schneider, Karsten Ragge und Robert Zweigert für anregende Diskussionen jeglicher Art und das freundschaftliche Verhältnis.

...allen Technischen Assistentinnen für die gute Zusammenarbeit.

...den Ärzten und Mitarbeitern der Dialyse-Station Braunschweig für das Verständnis, wenn ich mal wieder zu spät erschienen bin.

...meinen Eltern für ihr uneingeschränktes Vertrauen und ihre Unterstützung in allen schwierigen Situationen meines Lebens. Ohne ihren aufopfernden Einsatz wäre es mir nicht möglich gewesen, diese Arbeit zu beginnen; meiner Schwester Claudia für die notwendige Ablenkung am Meer und in den Bergen.

...meiner Partnerin Michaela, die auf soviel gemeinsame Zeit verzichten mußte - für ihre motivierende und liebevolle Unterstützung bis hin zum Lesen des Manuskripts.

*Müset im Naturbetrachten
Immer eins wie alles achten;
Nichts ist drinnen, nichts ist draußen:
Denn was innen, das ist außen.
So ergreift ohne Säumnis
Heilig öffentlich Geheimnis.*

*Freuet euch des wahren Scheins,
Euch des ernsten Spieles:
Kein Lebendiges ist Eins,
Immer ist's ein Vieles.*

(Goethe, Epirrhema)

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	IV
1 EINLEITUNG	2
1.1 FUNKTIONSTÖRUNGEN NACH KNOCKOUT	7
1.2 DIE REGULATION DER P75 ^{NGFR} -EXPRESSION	10
1.3 FRAGESTELLUNG	13
2 MATERIAL UND METHODEN	15
2.1 VERWENDETE PLASMID-VEKTOREN UND REKOMBINANTE DNA	15
2.2 AMPLIFIKATION DER VERWENDETEN PLASMIDE	17
2.3 BAKTERIENSTÄMME	17
2.4 GENTECHNISCHE STANDARDMETHODEN	17
2.5 UMKLONIERUNG DES P75 ^{NGFR}	18
2.6 RNA-PRÄPARATION	18
2.7 ZELLKULTUR	19
2.7.1 Zelllinien	19
2.7.2 Kulturmedien	20
2.7.3 Einfrieren der Zellen	21
2.7.4 Zelltransfektionen	21
2.7.4.1 Vorbereitung der DNA für die Transfektion	22
2.7.5 Herstellung stabil transfizierter Zelllinien	22
2.8 IMMUNHISTOCHEMIE	22
2.8.1 Immunfluoreszenzanfärbung von lebenden Zellen	23
2.9 POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR), RT-PCR UND PCR-PRIMER	24
2.9.1 Primer-Design	25
2.9.2 Reverse-Transkriptase- (RT) Reaktion	26
2.9.3 Polymerase-Ketten-Reaktion	27
2.9.4 PCR-Programm	28
2.10 CAT-TEST	28
2.10.1 Zellaufschluß	29
-Galaktosidase Farbttest	29
2.10.3 Durchführung des CAT-Tests	30
2.11 ZYMOGRAPHIE	30

3	ERGEBNISSE TEIL I: FUNKTION	33
3.1	STABILE P75 ^{NGFR} -ÜBEREXPRESSIONSKLONE ALS MODELLSYSTEM	33
3.2	CHARAKTERISIERUNG DER ZELLEN.....	39
3.2.1	<i>Immunhistochemischer Vergleich der Zelllinien.....</i>	39
3.2.1.1	Bestimmung des Wachstums der unterschiedlichen Zellklone.....	40
3.2.1.2	Bestimmung des Anteils der Desmin-positiven Zellen.....	41
3.2.1.3	Bestimmung des Grades der Zelldifferenzierung.....	42
3.2.2	<i>Expression der bHLH-Transkriptionsfaktoren in den vier Zelllinien</i>	44
3.3	METALLOPROTEINASEN	48
3.3.1	<i>Exprimieren Muskelzellen die Metalloproteinase Transin?</i>	51
4	ERGEBNISSE TEIL II: REGULATION	54
4.1	REGULATION DES P75 ^{NGFR} -GENS: EINFLUß VON ZELLDICHTE UND FGF-2	54
4.2	REGULATION DES P75 ^{NGFR} GENS: EINFLUß DES ADENOVIRUS E1A PROTEINS	59
4.3	UNTERSUCHUNGEN DES P75 ^{NGFR} -PROMOTORS	62
4.4	PROMOTORANALYSE MITTELS CAT-REPORTERGEN-KONSTRUKTEN	64
4.5	DIE TRANSAKTIVATORDOMÄNE IST ENTSCHEIDEND FÜR DIE P75 ^{NGFR} -4KB-CAT AKTIVIERUNG.....	68
4.6	MYOD AKTIVIERT DEN P75 ^{NGFR} IN PROLIFERIERENDEN ZELLEN.....	71
4.7	FUNKTIONSANALYSE UNTERSCHIEDLICHER P75 ^{NGFR} -PROMOTOR-CAT-- FRAGMENTE AUF DEN MYOD-EFFEKT	73
4.8	WELCHE DOMÄNEN DES MYOD-PROTEINS SIND FÜR DIE P75 ^{NGFR} -CAT AKTIVIERUNG NOTWENDIG?.....	76
4.8.1	<i>Mutationen in der cDNA des MyoD-Gens.....</i>	78
4.9	MIT MYOD INTERAGIERENDE PROTEINE REGULIEREN DIE P75 ^{NGFR} -4KB-CAT AKTIVITÄT.....	83
4.9.1	<i>Untersuchung des Einflusses von MEF-2A auf die MyoD vermittelte Aktivierung des p75^{NGFR}-4kb-CAT.....</i>	84
4.9.2	<i>Untersuchung des Einflusses von E1A auf die MyoD vermittelte Aktivierung des p75^{NGFR}-4kb-CAT.....</i>	88
4.9.3	<i>Die MyoD-VP16-Aktivierung des p75^{NGFR}-4kb-CAT wird auch durch E1A inhibiert.....</i>	91
5	DISKUSSION	94

5.1	DIE ÜBEREXPRESSION DES $p75^{NGFR}$ FÜHRT ZUR BESCHLEUNIGTEN DIFFERENZIERUNG IN C2C12-ZELLEN	95
5.2	TRANSIN WIRD IN L6 MUSKELZELLEN EXPRIMIERT	99
5.3	REGULATION DER $p75^{NGFR}$ -EXPRESSION	100
5.4	MYOD AKTIVIERT DEN $p75^{NGFR}$ -4KB-CAT IN PROLIFERIERENDEN ZELLEN ...	104
5.5	MYOD ERKENNT EINZELNE E-BOX IM $p75^{NGFR}$ -PROMOTOR	105
5.6	MUTATIONEN IM MYOD-MOLEKÜL GEBEN HINWEISE AUF DEN MECHANISMUS DER MYOD VERMITTELTEN AKTIVIERUNG DES $p75^{NGFR}$ -4KB-CAT	106
5.7	PROTEINE, DIE DIE MYOD-AKTIVIERUNG DES $p75^{NGFR}$ -4KB-CAT REGULIEREN, GEBEN WEITERE INFORMATIONEN ÜBER DIE FUNKTIONSWEISE DES TRANSKRIPTIONSFAKTORS	108
5.8	EINFLUß VON E1A AUF DIE $p75^{NGFR}$ -REGULATION.....	110
6	ANHANG	114
6.1	ABKÜRZUNGEN.....	114
6.2	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	116
7	LITERATUR	119
8	INDEX	134

ZUSAMMENFASSUNG

Als Untersuchungsmöglichkeit der Funktion des in Myoblasten exprimierten Neurotrophinrezeptors $p75^{NGFR}$, wurde die $p75^{NGFR}$ -Überexpression und die $p75^{NGFR}$ -Anti-Sinn-Expression in der Mausmuskelzelllinie C2C12 verwendet. Zwei unabhängige $p75^{NGFR}$ -Überexpressionsklone zeigten beide eine beschleunigte Differenzierung zu Myotuben im Vergleich zur parentalen Zelllinie. Dies wurde mit einer früheren Myogenin- und MHC-Expression dokumentiert. Der Anti-Sinn-Klon exprimierte weder Desmin noch MyoD. Obwohl der Anti-Sinn-Klon Myf5 exprimierte, wurde keine Myogenin- oder MHC-Expression in den Zellen nachgewiesen. Nach der Transfektion des $p75^{NGFR}$ -Anti-Sinn-Klons mit einem $p75^{NGFR}$ -Sinn-Plasmids konnte ein Klon isoliert werden, der wieder MyoD und Myogenin exprimierte und zu Myotuben differenzierte (Rescue). Eine vermutete Veränderung des Spektrum von sezernierten Metalloproteinasen durch den $p75^{NGFR}$ konnte nicht beobachtet werden.

Bei der Untersuchung der Regulation des $p75^{NGFR}$ -Gens in Muskelzellen zeigte sich, daß mit der Zunahme der Zelldichte der $p75^{NGFR}$ herunterreguliert wird. Des weiteren war zu beobachten, daß die Zugabe, des die Myoblastenproliferation fördernden Wachstumsfaktor FGF-2 zum Kulturmedium, die $p75^{NGFR}$ -Expression in Muskelzellen hochreguliert und daß die Expression des adenoviralen Proteins E1A die $p75^{NGFR}$ -Expression vollständig inhibiert.

Die Untersuchung eines $p75^{NGFR}$ -Reportergens ergab, daß von den vier bekannten myogenen bHLH-Transkriptionsfaktoren nur MyoD den $p75^{NGFR}$ -4kb-CAT aktivieren kann. Experimente mit dem adenoviralen Protein E1A und verschiedenen Mutanten dieses Moleküls zeigten ebenfalls die beim zellularen Gen beobachtete Inhibition der MyoD vermittelten Aktivierung des $p75^{NGFR}$ -Reportergens. Außerdem wurde die MyoD Aktivierung des $p75^{NGFR}$ -4kb-CAT durch das sich während der Myoblastendifferenzierung akkumulierende MADS-Box-Protein MEF-2A und nicht durch das schon in undifferenzierten Myoblasten exprimierte MEF-2D inhibiert. Eine nach dem Expressionsmuster des $p75^{NGFR}$ zu fordernde MyoD-Aktivität in Myoblasten konnte für die Aktivierung des $p75^{NGFR}$ -4kb-CAT beobachtet werden.

Einleitung

1 Einleitung

Allen Entwicklungszyklen gemeinsam ist, daß sich am Anfang einfachere Organisationsformen finden, z.B. das Ei und seine oft gleichartigen Furchungszellen, die sich dann zu immer komplizierteren Organisationsformen bis zur Stufe höchster Komplexität entwickeln. Im Gegensatz zu den Einzellern, die sich nur innerhalb ihrer Zelle in unterschiedliche Zellorganelle mit verschiedenen für die Zelle wichtigen Aufgaben unterteilen lassen, findet bei mehrzelligen Organismen eine für den gesamten Organismus notwendige Unterteilung von Zellen bzw. Zellgruppen statt, die spezifische Aufgaben im Organismus haben. Die innerhalb der Entwicklung eines Individuums stattfindende Spezialisierung bestimmter Zellen bezeichnet man als Zelldifferenzierung. Somit kann die Entwicklung eines Organismus als das geordnete Auftreten verschiedener Zelldifferenzierungen betrachtet und daher letztlich als nichts anderes als ein geordneter Ablauf von Genaktivitäten gesehen werden.

Die Zelldifferenzierung kann unabhängig sein, d.h. sie läuft autonom in der Zelle ab (Selbstdifferenzierung), oder sie kann abhängig sein (Induktion), d.h. sie wird durch Außenfaktoren eingeleitet (vgl. Czihak, Langer, Ziegler 1984).

In einem engen Zusammenhang zur Zelldifferenzierung steht das Wachstum, welches durch Zellvergrößerung und Zellvermehrung stattfindet. Organismen sind - von wenigen Ausnahmen abgesehen - durch ein gesetzmäßiges Wachstum ausgezeichnet, d.h. sie wachsen nicht beliebig weiter, es stellt sich vielmehr normalerweise eine definitive Endgröße mit schmalem Variationsbereich ein.

Eine Möglichkeit für den Organismus, das Wachstum bzw. die Differenzierung zu beeinflussen, ist die koordinierte Expression von Wachstumsfaktoren. Dies sind hoch spezifische Proteine, die oft nur in sehr geringen Konzentrationen (10^{-9} bis 10^{-11} mol/l) vorliegen. Diese meist kurzkettigen Polypeptide benötigen die einzelnen Zelltypen in unterschiedlicher Zusammenstellung.

Die Wachstumsfaktoren binden an, auf der Zelloberfläche exponierte spezifische Wachstumsfaktor-Rezeptoren und lösen dort eine an den Zellkern gerichtete Signaltransduktionskaskade aus, die die Transkription von spezifischen Genen im Zellkern aktiviert. Je nachdem, welche Gene durch das vom Rezeptor übermittelte Signal aktiviert werden, kann es z.B. zum Wachstum oder aber auch zum Tod der Zellen kommen.

Auch die Erforschung von Wirkmechanismen, die zum Wachstum von Neuronen führen, wird schon seit Anfang unseres Jahrhunderts betrieben. Erste Hinweise für die Existenz eines Nervenwachstumsfaktors (im weiteren als Nerve Growth Factor; NGF bezeichnet) erbrachten 1934 die Untersuchungen von Victor Hamburger an spinalen Motoneuronen und sensorischen Nervenzellen bei Hühnerembryonen nach einer Flügelknospen-Extirpation. Er stellte dabei fest, daß die Hypoplasie der Motoneurone des Vorderhorns und anderer Nervenzellen des Spinalmarks auf einen Mangel an Stimuli zurückzuführen ist, die zentripetal durch die Nervenfasern der ersten differenzierten Neuronen geleitet werden (Hamburger 1934). Ein Schüler Hamburgers, Elmer Beuker, konnte 1948 zeigen, daß Fragmente des Mäusesarkoms-180, wenn man sie in Hühnchenembryonen implantiert, chemische Eigenschaften besaßen, die das Wachstum von dorsalen Wurzelganglien in Richtung der neoplastischen Gewebe dirigierten und förderten. Weitere Experimente von Hamburger und Rita Levi-Montalcini veranlaßten Stanley Cohen 1954 aus zwei Tumoren eine Nukleoproteinfraktion zu isolieren, die *in vitro* das Nervenwachstum unterstützte. Außerdem fand er diesen Nervenwachstumsfaktor im Gift der Moccasin-Schlange und danach auch in dem Maushomolog der Schlangengiftdrüse, der unteren Speicheldrüse (Cohen und Levi-Montalcini 1956; Cohen 1960).

NGF war damit der erste Wachstumsfaktor, der isoliert wurde (Levi-Montalcini 1987).

Mit radioaktivem Jod markierten NGF wurden zwei unterschiedliche Rezeptoren auf der Zelloberfläche der NGF responsiven Pheochromozytoma-Zelllinie PC12 entdeckt, welche die biologische Aktivität des Faktors vermitteln. Die beiden Rezeptoren unterschieden sich in ihrer Affinität, NGF zu binden und wieder freizusetzen. Der hochaffine NGF-Rezeptor (140kDa) entläßt hierbei das NGF-Molekül sehr viel langsamer als der niedrigaffine (75kDa), weshalb letzterer auch als „schneller NGF-Rezeptor“ (fast NGF-Receptor) bezeichnet wurde (Vale und Shooter 1985; Mahadeo et al. 1994).

In den folgenden Untersuchungen wurden weitere NGF ähnliche Substanzen entdeckt, und es stellte sich heraus, daß jedes dieser Neurotrophine an einen speziellen hochaffinen Rezeptor bindet. Tabelle 1 faßt dies zusammen:

Neurotropher Faktor	Rezeptor
NGF	TrkA $p75^{NGFR}$
BDNF	TrkB $p75^{NGFR}$
NT3	TrkC/TrkB $p75^{NGFR}$
NT4	TrkB $p75^{NGFR}$
NT5	TrkB $p75^{NGFR}$

Tab. 1: Neurotrophe Faktoren und die Rezeptoren, die sie binden.

Im Gegensatz zu den hochaffinen Rezeptoren binden alle Neurotrophine den niedrigaffinen Rezeptor ($p75^{NGFR}$) mit gleicher Affinität (Rodriguez-Tebar et al. 1990, 1992).

Hemstead et al. (1991) konnten jedoch zeigen, daß der $p75^{NGFR}$ und der TrkA-Rezeptor für sich alleine genommen beide eine niedrige Affinität zu NGF haben. Erst wenn beide Rezeptoren in einer Zelle exprimiert werden, kann es zur Bildung eines hochaffinen Rezeptors kommen. Dies ließ vermuten, daß der $p75^{NGFR}$ und der TrkA bei der Bindung von NGF miteinander kooperieren. Diese Komplexbildung konnte von Ross et al. (1996) nachgewiesen werden und ergab außerdem, daß es nur zwischen dem $p75^{NGFR}$ und dem TrkA zu dieser Assoziation kommt, und nicht zwischen dem $p75^{NGFR}$ und anderen Tyrosinkinase-Rezeptoren. Der $p75^{NGFR}$ erhält dadurch eine gewisse Sonderstellung, da er zwar alle Neurotrophine binden kann, jedoch nur mit dem TrkA komplexiert.

Um den $p75^{NGFR}$ zu isolieren, wurden große genomische DNA-Fragmente der Zelllinie PC12 in Fibroblasten transfiziert, und danach mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers die Zellen isoliert, die den $p75^{NGFR}$ auf ihrer Oberfläche exprimierten (Chao et al. 1986; Radeke et al. 1987).

Die Klonierung und Sequenzierung der $p75^{\text{NGFR}}$ cDNA zeigte in einem Sequenzvergleich zwischen den verschiedenen Tierarten, daß der $p75^{\text{NGFR}}$ nur sehr geringe Unterschiede aufweist. So besteht eine Homologie von 92% zwischen dem $p75^{\text{NGFR}}$ der Ratte und dem Menschen (Bothwell 1991). Diese hohe Konservierung eines Gens innerhalb der Evolution deutet auf einen starken Selektionsdruck hin, d.h., daß Individuen, die eine Mutation in diesem Gen erleiden, so schwer beeinträchtigt sind, daß sie diese Mutation nicht mehr weitervererben können (vgl. Czehak, Langer, Ziegler 1984).

Nach der Entdeckung des $p75^{\text{NGFR}}$ wurden weitere Oberflächenmoleküle sequenziert, die alle in ihrer Struktur cysteinreiche Regionen aufweisen, wovon sechs Reste in der extrazellulären Domäne besonders hoch konserviert sind. Deshalb wird diese Genfamilie als NGF-Rezeptor-Familie bezeichnet.

Tumornekrosefaktor-(TNF-) Rezeptor I & II	Nekrose, aktiviert und induziert NO-Produktion
Fas	Apoptose
CD40	aktiviert den Zellzyklus in B-Lymphozyten

Tab. 2: $p75^{\text{NGFR}}$ -Familie (Loetscher et al. 1990; Schall et al. 1990; Stamenkovic et al. 1989)

Eine Zerstörung dieser cysteinreichen Region führt zum Verlust, NGF binden zu können (Yan und Chao 1991). In der transmembranen- bzw. zytoplasmatischen Domäne existieren kaum Homologien, jedoch haben die Moleküle der NGFR-Familie gemeinsam, daß sie nur eine einzelne Transmembrandomäne besitzen. Wie neuerliche Untersuchungen zeigten, scheint es auch Übereinstimmungen in der Signalübertragung zu geben, zumindest zwischen den TNF-Rezeptoren und dem $p75^{\text{NGFR}}$ (Frade et al. 1996), was das Interesse an der Funktion des $p75^{\text{NGFR}}$ steigert.

Um die Funktion eines einzelnen Proteins im Gesamtverband des Organismus feststellen zu können, ist es wichtig, sein Expressionsmuster aufzuklären, um erste Anhaltspunkte zu bekommen, in welchen Körperteilen und Organen es seine Funktion ausübt. Mit radioaktiv markierten Gensonden konnte ein weit gefächertes Expressionsmuster des $p75^{\text{NGFR}}$ nachgewiesen werden.

Peripheres Nervensystem	sympathische Nerven
Zentrales Nervensystem	
Lungen-Entwicklung	transient auf sich entwickelnden Bronchiolen
Ohr-Entwicklung	zeitweilig im Innenohr
Nieren-Entwicklung	im nicht induzierten Nierenmesenchym und später im glomerulären Teil; die Expression endet nach der Differenzierung in Glomerulie
Hämatopoetische Zellen	T-, B-Lymphozyten, Mastzellen, Granulozyten
während der Entwicklung im Kiemenbogen und den Extremitätenknospen	
während der Zahn-Entwicklung	Zahnepithelium und angrenzendes Mesenchym
Testis	Sertolizellen, Keimzellen, peritubuläre Zellen
Muskel-Entwicklung	Somiten, Myoblasten

Tab. 3: $p75^{\text{NGFR}}$ -Expressionsmuster; zusammengestellt nach: Bothwell 1991; Raivich et al. 1985; Heuer et al. 1990; Byers et al. 1990; Ernfors et al. 1991; von Bartheld et al. 1991; Durbeej et al. 1993; Baron et al. 1994; Seidl et al. 1996.

Die Expression des $p75^{\text{NGFR}}$ in den verschiedenen Organen läßt zunächst keine spezifische neuronale Funktion vermuten. Es zeigt sich dabei eher, daß der $p75^{\text{NGFR}}$ an allgemeinen, gewebeunspezifischen Prozessen beteiligt sein könnte.

1.1 Funktionsstörungen nach Knockout

Da der TrkA-Rezeptor und der $p75^{NGFR}$ in den verschiedenen Geweben nicht immer colokalisiert sind, stellt sich die Frage, welcher der beiden Rezeptoren die eigentliche Wirkung von NGF vermittelt.

Um diese Fragestellung zu klären, wurden Knockout Experimente durchgeführt. Hierfür wurde ein DNA-Fragment in embryonale Stammzellen gebracht, welches eine mutierte Kopie des $p75^{NGFR}$ bzw. des TrkA enthielt. Durch homologe Rekombination wurde das gesunde Gen ersetzt und die veränderten Stammzellen in einen frühen Mausembryo (Blastula-Stadium) injiziert. Die daraus resultierenden heterozygoten Nachkommen wurden untereinander verpaart und die Jungen, die nun für den Gendefekt homozygot sind, auf Abnormitäten hin untersucht.

Der Knockout des TrkA-NGF-Rezeptors verursachte eine Reihe von sensorischen und sympathischen Neuropathien. Die meisten Mäuse starben innerhalb eines Monats nach der Geburt. Diese Ergebnisse demonstrieren, daß der TrkA-Rezeptor der Hauptmediator der NGF-Effekte im Nervensystem ist (Smeyne et al. 1994).

Die $p75^{NGFR}$ -Knockout-Mäuse hatten einen deutlich milderen Phänotyp und zeigten weniger sensorische Nerven in der Haut der Fußsohlen, was zu einer verringerten Hitzesensitivität führte. Mit zunehmendem Alter der $p75^{NGFR} -/-$ Mäuse kam es zu bakteriell infizierten Geschwüren (Ulzera) an den Füßen (Lee et al. 1992).

Des weiteren konnte keine sympathische Innervation in der Zirbeldrüse nachgewiesen werden. Außerdem war die sympathische Innervation der Schweißdrüsen selektiv in einigen Fußsohlenbereichen nicht vorhanden (Lee et al. 1994a).

Um zu klären, welche Rolle der $p75^{NGFR}$ in der neurotrophen Signaltransduktion in Neuronen spielt, wurde die Neurotrophin-Sensitivität an $p75^{NGFR}$ -defizienten Dorsalwurzelganglien (DRG) und Oberen Cervikalganglien (SCG) aus $P75^{NGFR} -/-$ Mäusen untersucht. Das Ergebnis war eine 2-3fache Abnahme der NGF-Sensitivität, wenn die Ganglien am Embryonaltag 15 (E15) oder Postnaltag 3 (P3) entnommen wurden, während des natürlicherweise auftretenden Zellsterbens. Weiterhin wurde festgestellt, daß die $p75^{NGFR} -/-$ P3-SCG-Neuronen viel sensitiver auf höhere NT-3-Konzentrationen reagierten als Wildtyp-Ganglien (Lee et al. 1994b).

Lange Zeit war unklar, ob der $p75^{\text{NGFR}}$ überhaupt einen TrkA unabhängigen, eigenen Signaltransduktionsweg besitzt. Neuere Befunde machen jedoch deutlich, daß die NGF-Wirkung über den $p75^{\text{NGFR}}$ vermittelt werden kann (Carter et al. 1996).

Die Signalübertragung von der Zelloberfläche zum Zellkern nach der NGF-Bindung erfolgt beim TrkA-Rezeptor über die Aktivierung einer ins Zytoplasma reichenden Tyrosinkinase (Trk). Im weiteren Verlauf wird der Ras-/Raf-Signalweg aktiviert, wodurch es später zur c-fos-Aktivierung kommt (Greene und Kaplan 1995).

Für die Signalvermittlung des $p75^{\text{NGFR}}$ wurden verschiedene Möglichkeiten beschrieben. Einerseits konnte eine Assoziation einer Purin-Analogen sensitiven Protein-Kinase an die zytoplasmatische Domäne nachgewiesen werden, die nach der Bindung von NGF aktiviert wird (Volonté et al. 1993). Andererseits wurde eine Involvierung des glycosyl-phosphatidylinositol / inositol phosphoglycan-Systems beschrieben (Represa et al. 1991).

Eine weitere Möglichkeit der Signalübertragung von der Zelloberfläche ins Zellinnere ist die Internalisierung des an die beiden Rezeptoren gebundenen NGF. Hierbei wird NGF mit den Rezeptoren retrograd durch die Axone der Neuronen zum Zellkörper transportiert (Johnson et al. 1987; Ehlers et al. 1995).

Des weiteren konnte in letzter Zeit immer häufiger gezeigt werden, daß es nach der Bindung von NGF an den $p75^{\text{NGFR}}$, ähnlich wie beim TNF-Rezeptor, zur Aktivierung des Sphingomyelin-Zyklus kommt (Dobrowsky et al. 1994).

Innerhalb der Aktivierung des Sphingomyelin-Zyklus durch die Bindung von NGF an den $p75^{\text{NGFR}}$, wird Sphingomyelin hydrolysiert und bildet Ceramide, die die c-Jun aminoterminalen Kinase (JNK) aktivieren (Casaccia-Bonofil et al. 1996).

Wie Experimente mit C_2 -Ceramiden zeigten, können diese in Zellkulturen die Differenzierung und den Zelltod induzieren (Hannun 1994). Andere Autoren berichteten, daß eine Ceramid-Applikation an konfluent gewachsenen Fibroblasten einen verstärkten H_3 -Thymidin-Einbau bewirkt (Olivera et al. 1992).

Ein weiterer wichtiger Beitrag zur Aufklärung der Signaltransduktion von NGF über den p75^{NGFR}-Rezeptor war die Beobachtung, daß in Zellen, die keinen TrkA exprimierten, nur NGF über den p75^{NGFR} den Transkriptionsfaktor NFκB aktiviert. BDNF und NT-3 vermögen dies nicht (Carter et al. 1996).

Wie die verschiedenen Experimente vermuten lassen, scheint es keinen spezifischen Signaltransduktionsweg des p75^{NGFR} zu geben, so daß einige Autoren annehmen, daß der durch den p75^{NGFR} übertragene Signalweg vom Zellsystem abhängt, in dem er exprimiert wird (Hemstead et al. 1989; Casaccia-Bonnet et al. 1996).

So vielfältig wie die einzelnen Signalübertragungsmöglichkeiten des p75^{NGFR} beschrieben wurden, so vielseitig sind die über den p75^{NGFR} vermittelten Funktionen in den verschiedenen beschriebenen *in-vitro* und *in-vivo* Modellen. So konnte gezeigt werden, daß der p75^{NGFR} mit TrkA zusammen einen hochaffinen NGF-Rezeptor bildet und den biologischen Effekt von NGF auf Zellen verstärkt (Hemstead 1991; Ross et al. 1996; Hantziropoulos et al. 1994; Verdi 1994). Des weiteren unterstützt der p75^{NGFR} die Diskriminierung der verschiedenen neurotrophen Faktoren bei der Bindung an den TrkA, im besonderen zwischen NGF und NT3 (Lee et al. 1994; Benedetti et al. 1993). Außerdem wurde beobachtet, daß der p75^{NGFR} die Zellproliferation im sich entwickelnden Ohr (Varela-Nieto et al. 1991), sowie von primären sympathischen Ganglien im Hühnchen-Embryo in Abwesenheit von TrkA vermittelt (Goldstein et al. 1997) und die Zellmigration von Schwannzellen auf den Nervenfasern fördert (Anton et al. 1994).

In Anlehnung zur nahen Verwandtschaft zum TNF-Rezeptor wurde berichtet, daß der p75^{NGFR} den Zelltod von kultivierten Oligodendrozyten nach dem Binden von NGF und der daraus resultierenden Zunahme der c-Jun aminoterminalen Kinase- (JNK) Aktivität vermittelt (Casaccia-Bonnet et al. 1996) und das Absterben von retinalen Neuronen im Hühnchen in Abwesenheit von TrkA durch endogenes NGF in der frühen Entwicklung bewirkt (Frade et al. 1996).

Diese sehr vielseitigen Wirkungen des p75^{NGFR} auf die Zellen, welche zum Teil temporal begrenzt sind bzw. sogar tödlich für die Zellen sein können, erfordern einen sehr komplexen Regulationsmechanismus.

1.2 Die Regulation der $p75^{\text{NGFR}}$ -Expression

Für das zeitlich korrekte Anschalten und die zellspezifische Expression von Genen sind Promoter-Sequenzen in der DNA verantwortlich. Diese Promotoren eines Gens enthalten Erkennungssequenzen, die von Proteinen - den Transkriptionsfaktoren - gebunden werden und die die Transkription des betreffenden Gens einleiten. Da viele verschiedene Proteine an einem solchen Transkriptionskomplex beteiligt sind, die ihrerseits durch Transkriptionsfaktoren reguliert werden, gibt es eine Vielzahl von Regulationsmöglichkeiten.

Bei der Sequenzcharakterisierung des $p75^{\text{NGFR}}$ -Promotors wurde ein hoher GC-Gehalt und mehrere GC-Boxen entdeckt, die potentielle Bindungsstellen des Transkriptionsfaktors Sp1 repräsentieren. Es fehlen jedoch die „TATA“- und „CAAT“-Konsensus-Sequenzen, was für Gene charakteristisch ist, die nicht zellspezifisch reguliert werden, sondern die für den Lebenserhalt der Zelle wichtig sind (housekeeping genes) (Sehgal et al. 1988). Es ist jedoch auffällig, daß eine Reihe von Zellwachstum kontrollierenden Genen, wie z.B. c-Harvey-ras (Ishii et al. 1985a), c-Kirsten-ras (Hoffmann et al. 1987), der EGF-Rezeptor (Ishii et al. 1985b) und der Insulin-Rezeptor (Araki et al. 1987) ebenfalls keine „TATA“- oder „CAAT“-Konsensus-Sequenz enthalten, dafür aber multiple GC-Boxen. Die ähnlichen Promotorelemente lassen daher vermuten, daß der $p75^{\text{NGFR}}$ in Zellwachstumsprozessen involviert ist, zumindest die Regulation dieser Gene Gemeinsamkeiten aufweisen (Bothwell et al. 1991).

Unterstützt wird diese Annahme durch nachfolgende Experimente, in denen gezeigt wurde, daß Substanzen, wie All-trans-Retinsäure und der Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2 (FGF-2), die Expression des $p75^{\text{NGFR}}$ hochregulieren (Scheibe et al. 1992; Metsis et al. 1992; Taiji et al. 1992).

Um die Expression des $p75^{\text{NGFR}}$ in den unterschiedlichen neuronalen und mesenchymalen Zellen besser dokumentieren zu können, wurden transgene Mäuse generiert. Ein cosmid-Klon, der 8kb des 5'-Bereichs und 7,5kb des 3'-Bereichs des $p75^{\text{NGFR}}$ -Gens enthielt, zeigte die bereits zuvor mit in-Situ-Hybridisierungen festgestellten Expressionsmuster, vor allem die der dorsalen Wurzelganglien, der sympathischen Ganglien und der cholinergen Neuronen im basalen Vorderhirn (Patil et al. 1990). Ein auf 4kb verkürzter 5'-Bereich ohne 3'-Sequenzen des $p75^{\text{NGFR}}$ Gens

hingegen war zwar noch ausreichend für das vollständige mesenchymale Expressionsmuster, zeigte aber keine Expression in sensorischen oder sympathischen Ganglien oder im Vorderhirn (Huber und Chao 1995).

Die Experimente zeigen, daß für die Regulation der natürlich vorkommenden Genexpression des $p75^{\text{NGFR}}$ 8kb des 5'-Bereichs und 7,5kb des 3'-Bereichs ausreichend sind. Offensichtlich gibt es eine deutliche Trennung zwischen der Regulation des $p75^{\text{NGFR}}$ in bestimmten neuronalen Zellen (8kb) und mesenchymalen Zellen (4kb), was auf ein komplexes Set von unterschiedlichen Regulations-mechanismen hindeutet (Huber et al. 1995).

Ein weiterer wichtiger Beitrag zur Aufklärung der Regulationsmechanismen der $p75^{\text{NGFR}}$ -Expression war, daß die bHLH-Transkriptionsfaktoren ME1a und ME1b die Repression des $p75^{\text{NGFR}}$ -Gens in der neuronalen Zelllinie PC12 vermitteln können (Chiaramello et al. 1995).

Wie bereits erwähnt wurde, ist die $p75^{\text{NGFR}}$ -Expression nicht auf neuronale Zellen beschränkt, sondern wird $p75^{\text{NGFR}}$ auch in mesenchymalen Zellen exprimiert. Mathieu et al. (1971) beobachteten, daß Myoblasten, die zufällig bei der Untersuchung des Effekts von NGF auf einen kultivierten Epiblast einer Gastrula mit in die Kulturschale gekommen waren, unter dem Einfluß von NGF zu hypertrophieren begannen. Dieses Experiment veranlaßte Radeva (1978), Wassermolchembryonen in einer stark NGF-haltigen Lösung zu kultivieren. Er stellte fest, daß es nach 24h Inkubation zu einer deutlich beschleunigten Zelldifferenzierung der Myoblasten, Neuroblasten und Spongioblasten im Vergleich zu nicht behandelten Embryonen gekommen war.

Auch der zeitliche Verlauf der $p75^{\text{NGFR}}$ -Expression deutet auf eine funktionelle Rolle während der Myogenese in Rattenembryonen hin. Wheeler und Bothwell (1992) zeigten, daß der $p75^{\text{NGFR}}$ auf MyoD1-positiven Myoblasten exprimiert ist. Sie stellten weiter fest, daß es zu einer umfassenden Coexpression zwischen dem $p75^{\text{NGFR}}$ und dem Zelladhensionsmolekül NCAM während der Embryonalentwicklung, im speziellen der Myogenese, kommt. NGF wurde ebenfalls in den an die Myoblasten angrenzenden Zellen gefunden, was die Autoren dahingehend interpretierten, daß NGF hier als paracrinere Faktor für die $p75^{\text{NGFR}}$ positiven Myoblasten diene, da die motoneurone Innervation nicht von NGF beeinflusst wird.

Zusammenfassend hat sich gezeigt, daß NGF über zwei verschiedene Rezeptoren seine Wirkung auf die Zellen ausübt. Einerseits gibt es einen 140kDa großen NGF-Rezeptor mit einer zytoplasmatischen Tyrosinkinase-Domäne, über den die meisten neuronalen NGF-Effekte, wie das Überleben, die Entwicklung und die Differenzierung von Neuronen im Nervensystem, vermittelt werden. Andererseits bindet NGF an einen 75kDa großen Rezeptor.

Der zu Anfang diskutierte hochaffine Rezeptor kann nur durch ein Heterodimer aus TrkA und p75^{NGFR} gebildet werden, der jedoch keine besondere biologische Relevanz zu haben scheint, bis auf den Umstand, daß das TrkA / p75^{NGFR}-Heterodimer eine bessere Unterscheidung zwischen den einzelnen Neurotrophen bewirkt. Im Gegensatz zum TrkA hat der p75^{NGFR} offensichtlich mehrere Möglichkeiten der Übermittlung einer Signaltransduktion in den Zellkern. Welcher Signalübertragungsweg zur Vermittlung des NGF-Signals eingesetzt wird, scheint zellsystemabhängig mit den daraus resultierenden unterschiedlichen Ausprägungen (mitotisch, apoptotisch, differenzierend) zu sein. Die hohe Konservierung des p75^{NGFR}-Gens innerhalb der verschiedenen Spezies impliziert einen selektiven Einfluß, was für eine entscheidende Funktion des p75^{NGFR} innerhalb des Organismus spricht. In p75^{NGFR}-Knockout-Experimenten konnten verschiedene Abnormitäten im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen beobachtet werden. Inwieweit diese Entwicklungsfehler für ein Überleben in freier Natur entscheidend sind, wurde nicht untersucht. Über Experimente zur Aufklärung der Funktion bzw. der Regulation des p75^{NGFR} in Muskelzellen finden sich in der Literatur nur spärliche Angaben. Die Tatsache, daß der p75^{NGFR} in Muskelzellen zeitlich begrenzt, während der Entwicklung und bei Regenerationsprozessen exprimiert wird, sowie seine hohe Konservierung machen ihn zu einem lohnenden Untersuchungsobjekt zur Aufklärung von Differenzierungs-vorgängen.

1.3 Fragestellung

Eine Reihe von Hinweisen sprechen für eine Funktion des $p75^{\text{NGFR}}$ innerhalb differenzierender Zellvorgänge, wie z.B. das zeitlich begrenzte Erscheinen in Regionen, die zu differenzieren beginnen. Auch die hohe Konservierung des $p75^{\text{NGFR}}$ -Gens spricht für eine biologische Relevanz bei Entwicklungs- und Regenerationsprozessen. Die Knockout-Experimente zeigten jedoch einen nur sehr milden Phänotyp. Dabei muß man aber berücksichtigen, daß die vielen kompensatorischen Möglichkeiten, die *in vivo* existieren, nur einen Teil des vorhandenen Wirkspektrums des $p75^{\text{NGFR}}$ aufzeigen können. Daher ist es unerlässlich, für die genaue Untersuchung der Funktion des $p75^{\text{NGFR}}$ die Komplexität zu verringern.

Teil I

Der $p75^{\text{NGFR}}$ wird nicht nur von neuronalen Zellen exprimiert, sondern auch von nicht neuronalen. Viele Untersuchungen, die die Funktionen des $p75^{\text{NGFR}}$ aufklären sollten, wurden an neuronalen Zellsystemen durchgeführt. Aber gerade die transiente Expression des $p75^{\text{NGFR}}$ auf Myoblasten deutet auf eine funktionelle Rolle auch während der Myogenese hin.

Es stellt sich daher im ersten Teil dieser Arbeit die Frage, welche Funktion $p75^{\text{NGFR}}$ in Muskelzellen hat.

Teil II

Im zweiten Teil dieser Arbeit ist es zum einen von Interesse zu untersuchen, welche genregulatorischen Mechanismen für die $p75^{\text{NGFR}}$ -Expression verantwortlich sind. Zum anderen stellt sich die Frage, ob sich dabei Zusammenhänge zwischen der Regulation des $p75^{\text{NGFR}}$ in Muskelzellen und den in der Literatur beschriebenen Regulationsmechanismen in neuronalen Zellen finden lassen.

Material und Methoden

2 Material und Methoden

Alle Chemikalien, Biochemikalien sowie Enzyme wurden in Analysenqualität von den folgenden Firmen bezogen:

Life Technologies
Merck, Darmstadt
New England Biolabs
Pharmacia, Freiburg
Serva, Heidelberg
Sigma, Deisenhofen
Stratagene, Heidelberg

Die radioaktiven Substanzen stammen von Amersham Buchler. Die Herkunft weiterer Substanzen sind im Text vermerkt.

2.1 *Verwendete Plasmid-Vektoren und rekombinante DNA*

pEMSV- α -scribe (Davis et al. 1987)

pKI^{neoSal}

PUC9 NGFR (Shooter)

pEMSV p75^{NGFR}-Sinn

pEMSV p75^{NGFR}-Anti-Sinn

pEMSV-MEF-2A (Buchberger)

pRSV/ β Gal (Braun et al. 1990)

pEMBL/15-500 Myogenin-CAT (Braun et al. 1990)

pEMSV-MyoD (Davis et al. 1987)

MyoD-VP16 (Weintraub et al. 1991)

MyoD-ER (Hollenberg, S. M. et al. 1993)

pEMSV-Myf5 (Braun)

Myf5-ER (Ragge 1996)

RSVE1A (Braun) E1A Mutanten (Schneider)

Id-cDNA (Benezra 1990)

Die pEMSV-MyoD Mutanten wurden von R. Schreck zur Verfügung gestellt und sind beschrieben in (Davis et al. 1992; Tapscott et al. 1988; Bengal et al. 1994; Weintraub et al. 1991):

pEMSV-MyoD $\Delta 3-56$ (Δ N)

pEMSV-MyoD $\Delta 63-99$

pEMSV-MyoD $\Delta 102-135$

pEMSV-MyoD $\Delta 143-162$

pEMSV-MyoD A114 \Rightarrow D114

pEMSV-MyoD A114 \Rightarrow N114

pEMSV-MyoD A114 \Rightarrow T114

pEMSV-MyoD T115 \Rightarrow N115

Die pBLCAT2 p75^{NGFR} Promotorfragmente wurden von M. Metsis und T. Neuman zur Verfügung gestellt und sind beschrieben in (Metsis et al. 1992; Chiaramello et al. 1995):

pBLCAT2 -9500

pBLCAT2 -4800

pBLCAT2 -1839

pBLCAT2 -1386

pBLCAT2 -1050

pBLCAT2 -400

pBLCAT2 -4800--1839TK

pBLCAT2 -2600--1839TK

pBLCAT2 -1386--393TK

pBLCAT2 -1050--393TK

pBLCAT2 -860--393TK

pBLCAT2 -620--393TK

2.2 Amplifikation der verwendeten Plasmide

Die verwendeten Plasmide wurden in XL-Blue E.Coli-Bakterien transformiert und in Großkulturen unter Ampicillinselektion (0,1mg/ml) amplifiziert. Die einzelnen Plasmide wurden über DNA-Aufreinigungssäulen der Fa. Qiagen und dem dazugehörigen Protokoll isoliert.

2.3 Bakterienstämme

Für die Umklonierung und Amplifizierung der Plasmid-DNA wurden E. Coli-Bakterienzellen des Stammes XL1-Blue (supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac⁻; F[proAB⁺ lacI^qlacZdeltaM15 Tn10 (tet^r)] verwendet. (Bullock et al., 1987) (Fa. Stratagene, Heidelberg).

2.4 Gentechnische Standardmethoden

Soweit nicht näher erläutert, wurden die gentechnischen Standardmethoden den Anleitungen aus „Molecular Cloning“ (Sambrook et al. 1989) und „Current Protocols in Molecular Biology“ (Ausbeul et al. 1992) entnommen. Hierzu gehören die DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen; Fällung von Nucleinsäuren; Auffüllen von 5'-überhängenden DNA-Enden mit dem Klenow-Fragment; Dephosphorylierung von DNA-Enden; Ligation und Subklonierung von DNA-Fragmenten; Transformation von E.Coli-XL1-Blue-Zellen; Präparation von Plasmid-DNA aus transformierten E.Coli-XL1-Blue-Zellen im analytischen und präparativen Maßstab; photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren; Agarose-Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten; Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen; Northern Blot-Transfer und Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden; Transfektion von tierischen Zellen in Zellkultur mit der Kalziumphosphat-Methode; Sequenzreaktionen wurden nach der Methode von Sanger et al. (1977) unter Verwendung des „Sequenase-Version-2.0-DNA-Sequencing-Kits“ (Fa. Amersham, Braunschweig) durchgeführt. Zur Elektrophorese wurde ein entsprechend beschriebenes Polyacrylamid-Gel verwendet.

Alle weiteren angewandten Methoden sind in den einzelnen Experimenten beschrieben oder wurden entsprechend den Kit-Angaben durchgeführt.

2.5 Umklonierung des p75^{NGFR}

Um die Funktion des p75^{NGFR} in tierischen Zellen untersuchen zu können, mußte die cDNA aus einem bakteriellen Vektor in einen eukaryotischen Expressionsvektor umkloniert werden.

Die von Bitler und Shooter zur Verfügung gestellte p75^{NGFR}-cDNA, welche in die PstI-site des pUC 9 unter der Verwendung von GC-tailing kloniert worden war, wurde mit einem EcoRI / HindIII-Verdau herausgeschnitten. Wie von Shooter beschrieben wurde, könnte es bei der 3238 bp großen cDNA in einigen Vektoren zu Umlagerungen kommen, was zu Problemen bei der Klonierung in andere Vektoren führen könnte. Um dies zu verhindern, wurde mit einem HindII-Verdau ein Teil der nicht für das Protein kodierenden 3'-Region weggeschnitten. Das verbleibende 2050bp große p75^{NGFR}-Fragment wurde am 5'-End aufgefüllt und mit EcoRI-Linkern versehen. Danach wurde das Fragment in die EcoRI-site des eukaryotischen Expressionsvektors pEMSV2⁺-scribe (Davis et al. 1987) kloniert. Die Orientierung des einklonierten 2050bp Fragments wurde mit einem ScaI / BglII-Verdau überprüft. Für das Einklonieren des p75^{NGFR}-Fragments in den pEMSV-Vektor wurde dieser zuvor mit EcoRI linearisiert und danach dephosphoryliert (CIP).

2.6 RNA-Präparation

Alle verwendeten Zelllinien wurden in Nunc-Zellkultur-Dishes mit 6- und 10cm Durchmesser kultiviert. Die Zellen bildeten alle adherierende Monolayer. Für die RNA-Präparation wurden die Zellen 3x mit PBS gewaschen, danach wurde 350µl Lysispuffer hinzugegeben. Die lysierenden Zellen wurden mit einem sterilen Plastischaber von der Kulturschale gelöst und in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Zur vollständigen Auflösung der Zellmembran wurden die Reaktionsgefäße mit den Zellysaten 3-5min auf Eis gestellt.

Danach wurden die nicht lysierten Zellkerne für 15 sec. sedimentiert. Der Zellextraktüberstand wurde abgenommen und in ein mit 350µl GTC-Puffer gefülltes 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellproteine wurden mit 150µl Chloroform extrahiert bzw. gefällt. Nach 10minütigem Zentrifugieren wurde die wässrige Phase in ein weiteres 1,5ml Reaktionsgefäß überführt und die RNA bei -20°C mit 0,05 Volumen 3M Natriumacetat pH 5,2, sowie 800µl Isopropanol über Nacht gefällt. Das Präzipitat wurde mit 75%igem Ethanol gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet. Die getrocknete RNA wurde in 10-20µl bidest. Wasser aufgenommen und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

GTC-Puffer: 4 M Guanin-thiocyanat	RNA-Lysisbuffer: 0,15 M NaCl
0,15 M NaCl	2 mM MgCl ₂
5 mM EDTA	0,5% NP-40
10 mM Tris-HCl pH 7,5	10 mM Tris-HCl, pH 7,5
0,1 M β-Mercaptoethanol	

2.7 Zellkultur

Die Zellen wurden je nach Verwendungszweck in 6- bzw. 10 cm Zellkulturschalen (Fa. Nunclon, Roskilde, Dänemark) kultiviert. In den Experimenten wurden folgende Zelllinien verwendet:

2.7.1 Zelllinien

Fibroblasten

- NIH 3T3 (Jainchill et al. 1969; ATCC-Nr.: CRL-1658)
- C3H10T1/2 (Renzikoff et al. 1973; ATCC-Nr.: CCL-226)
- C3H10T1/2 MEF-2A stabile (Buchberger, A.)

Myoblasten

- C2C12 (Yaffe und Saxel 1977; ATCC-Nr.: CRL-1772)
- L6 (Yaffe 1968; ATCC-Nr.: CRL1458)
- L6 E1A (Braun et al. 1992)

2.7.2 Kulturmedien

Wachstumsmedium (GM):	DMEM (Life Technologies, Eggenstein) 100U/ml Penizillin 100µg/ml Streptomycin 20mM Glutamin 10% FCS
Differenzierungsmedium (DM):	DMEM 100U/ml Penizillin 100µg/ml Streptomycin 20mM Glutamin 10% HS
Differenzierungsmedium für L6-Zellen (DML6):	DMEM 100U/ml Penizillin 100µg/ml Streptomycin 20mM Glutamin 10% HS 2%FCS
LH-Medium für Proteaseexperimente:	DMEM 0,2% Lactalbumin hydrolysat

Einfriermedium:	DMEM
	100U/ml Penizillin
	100µg/ml Streptomycin
	20mM Glutamin
	20% FCS
	10% DMSO

Alle Zellen wurden bei 37°C und 8% CO₂ in einem humiden Klima kultiviert.

2.7.3 Einfrieren der Zellen

Alle verwendeten Zellen wurden aus eingefrorenen Kryoröhrchen bei 37°C im Wasserbad schnell aufgetaut und nach vorsichtigem Verdünnen mit GM platiert. Für eine eigene Stockherstellung wurden die Zellen bis zu 50% Konfluenz wachsen gelassen, die DNA mit sterilem 1xPBS gewaschen und für 2-3min mit 1xTrypsin/EDTA (0,05% Trypsin, 0,02% EDTA (w/v)) inkubiert (trypsinisiert). Danach wurden die Zellen mit einer Pipette durch Treturieren von der Zellkulturschale abgelöst und das Trypsin mit GM neutralisiert. Nach vorsichtigem Zentrifugieren (900rpm) und Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in Einfriermedium resuspendiert (1Mio. Zellen/ml) und zunächst über Nacht bei -70°C in 1,8ml-Kryo-Röhrchen eingefroren. Am nächsten Tag wurden die Kryo Röhrchen mit den Zellen in flüssigen Stickstoff verbracht.

2.7.4 Zelltransfektionen

Die für die Transfektion bestimmten Zellen wurden 24h lang zu 500.000 Zellen pro 10cm Kulturschale in GM kultiviert. Danach wurden die Zellen trypsinisiert und erneut zu 150.000 Zellen pro 6cm Kulturschale mit GM platiert und nach zwei Stunden das Medium gegen frisches ausgetauscht. Am nächsten Tag wurde das GM abermals gewechselt und Zellen nach 4h mit der vorbereiteten DNA über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurde das Medium gewechselt und je nach Experiment weiter kultiviert.

2.7.4.1 Vorbereitung der DNA für die Transfektion

Für die Transfektion einer 6cm Zellkulturschale wurden 750µl HBS-Puffer in klaren 15ml Röhrchen vorgelegt, die jeweiligen DNA-Mengen hinzupipettiert und 48µl 2M Calciumchlorid tropfenweise unter leichtem Schütteln zugegeben. Der vollständige Transfektionsansatz wurde 30min bei Raumtemperatur stehengelassen und danach auf die vorbereiteten Zellen gegeben.

HBS-Puffer: 0,818% NaCl

0,595% Hepes

0,02% Na₂PO₄ pH 7,05

2.7.5 Herstellung stabil transfizierter Zelllinien

Nach der Einklonierung des p75^{NGFR} in den eukaryotischen Expressionsvektor pEMSVα-scribe wurden zwei Bakterienklone, die das Gen in unterschiedlicher Orientierung enthielten, isoliert. Sinn- und Anti-Sinn-Plasmide wurden mit einem Selektionsplasmid, welches das Gen für Neomycin-Resistenz enthielt, in die Mausmyoblasten-Zelllinie C2C12 mit der Calciumphosphatmethode cotransfiziert. Das Konzentrationsverhältnis zwischen den Expressionsvektoren und dem Neomycin-Resistenzplasmid betrug 1:20. Nach der Transfektion wurden die Zellen 1:6 bis 1:8 vereinzelt und in 10cm Kulturschalen in GM + 1mg/ml Neomycin (G418) weiter kultiviert. Nach zehn Tagen wurden die entstandenen Resistenzklone in Mikrotiterplatten überführt. Die einzelnen Klone wurden zunächst auf 6cm und später auf 10cm Kulturschalen verbreitet und in Kryo Röhrchen eingefroren. Die Sinn-Klone wurden durch immunhistochemische Anfärbung der Zellen mit dem Anti-p75^{NGFR} Antikörper 192 (Boehringer-Mannheim) und dem DAB-Kit (Amersham) detektiert. Die Anti-Sinn-Klone wurden mittels Northern-Blot auf eine p75^{NGFR} Anti-Sinn-mRNA-Expression hin untersucht.

2.8 Immunhistochemie

Zum Nachweis von verschiedenen Proteinen in den in den kultivierten Zellen wurden antikörpergestützte Anfärbemethoden eingesetzt. Für den immunhistochemischen

Nachweis des p75^{NGFR} wurde ein Kit der Fa. Amersham eingesetzt, und für die Myosin-Heavy-Chain-Nachweise der Elite ABC-Vectastain-Kit der Fa. Camon, (Wiesbaden).

Die kultivierten Zellen wurden 2x mit PBS gewaschen, danach mit eiskaltem Methanol/Eisessig (95%:5% v/v) in der Kulturschale fixiert und für mindestens 30min bei -20°C eingefroren. Nach dem Auftauen wurden die Zellen mit 1x75% Methanol/PBS, 1x 50% Methanol/PBS, 1x 25% Methanol/PBS und 3x PBS gewaschen. Um unspezifische Antikörperreaktionen zu vermeiden, wurden die Zellen mit einer Lösung aus 5% Pferdeserum bzw. Ziegeserum und 1% BSA (v/v) in PBS für 1h bei RT präinkubiert. Danach wurden die Zelle mit dem jeweiligen monoklonalen Antikörper, der in einer Lösung aus 1% Serum und 1% BSA in PBS verdünnt wurde, für 1h bei RT inkubiert, 3x für 5min mit PBS + 1%BSA gewaschen und mit einem Anti-Maus-Antikörper des jeweilig verwendeten Kits für 1h bei RT inkubiert. Nach 3 x 5min Waschen mit PBS + 1% BSA wurden die Zellen für eine weitere Stunde mit der jeweiligen zweiten Lösung inkubiert und danach die Färbereaktion mit 1mg/ml konzentriertem Diaminobenzidien in 0,05M Tris-HCl pH7,5 + 0,03% H₂O₂ Lösung für 2 - 15min durchgeführt (DAB-Färbung). Die Färbereaktion wurde durch Waschen mit PBS gestoppt.

2.8.1 Immunfluoreszenzanfärbung von lebenden Zellen

Eine Methode zum Nachweis der Funktion eines Proteins in der Zelle ist das „Ausschalten“ eines Gens. Hierfür gibt es verschiedene Möglichkeiten, wovon eine Methode die Überexpression der Anti-Sinn-mRNA ist. Durch eine darauffolgende Überexpression der Sinn-mRNA in diesen Zellen kann man die Anti-Sinn-mRNA wiederum eliminieren und die aus der Anti-Sinn-Expression resultierenden Veränderungen der Zellen wieder aufheben, die Zellen also retten (Rescue).

Da der p75^{NGFR}-Anti-Sinn exprimierende Klon bereits G418 resistent war, wurden nach erfolgter Transfektion des p75^{NGFR}-Sinn-Plasmids die p75^{NGFR} exprimierenden Zellen mit einer *in vivo* Immunfluoreszenz-Methode identifiziert.

Zu Beginn wurden die Zellen nach der Transfektion mit Trypsin von der Zellkulturschale gelöst, die Anzahl der Zellen bestimmt und zu 5000 Zellen auf eine 10cm Zellkulturschale ausgesät. Nach vier Tagen unter normaler Zellkulturführung (alle zwei Tage wurde das GM gewechselt), wurde ein p75^{NGFR} bindender

monoklonaler Antikörper, der 1:100 in 2ml GM verdünnt worden war, zu den Zellen gegeben und für 30min im Zellkulturbrutschrank inkubiert. Danach wurden die Zellen 3x mit temperiertem 1xPBS gewaschen und mit einem mit dem fluoreszierenden Farbstoff (FITC) conjugierten Anti-Maus-Antikörper (Boehringer-Mannheim), der ebenfalls 1:100 in 2ml GM verdünnt worden war, nochmals für 30min im Brutschrank inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Zellen mit vorgewärmtem 1xPBS, wurden die fluoreszierenden p75^{NGFR} exprimierenden Zellklone identifiziert und isoliert.

2.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR), RT-PCR und PCR-Primer

Für den Nachweis der Expression des p75^{NGFR}, von Myogenin und der Metalloproteinase Transin wurde das Verfahren der Reversen-Transkriptase-PCR angewandt. Mit dieser PCR Technik können nach dem Design von genspezifischem Primer und der Reversen Transkriptase Reaktion die Expression des entsprechenden Gens sehr schnell und auch noch in sehr geringer Konzentrationen nachgewiesen werden.

2.9.1 Primer-Design

Für das Design des p75^{NGFR} und transinspezifischen Primer-Paares wurden folgende Regeln eingehalten:

- Der Primer sollte zwischen 17 und 27 Basen lang sein.
- Die Schmelztemperaturen des 5' und 3' Primers sollte sich um nicht mehr als 2°C unterscheiden.
- Die Schmelztemperaturen (T) wurden nach der Formel $T = 4 \times (G + C) + 2 \times (A + T) - (0 - 10)$ berechnet.
- Das 3'-Ende sollte aus zwei Purinbasen bestehen.
- Das durch die PCR gebildete Fragment sollte nicht kleiner als 100bp und nicht größer als 500bp sein.
- Die beiden Primer sollten an zwei unterschiedliche Exons binden.
- Die Primer sollten auf die Möglichkeit der Dimerisierung überprüft werden.

	Sequenz (5' → 3')	Positionen	Größe
Primer p75^{NGFR}:			
Sinn	CACATACTCAGACGAAGCCAACCAG	457-1210	753bp
Anti-Sinn	CAGGCGGCTAAAAGGGCATCAAG		
Primer Transin:			
Sinn	CACCAAATCTAACTCTCTGGACCC	879-1155	276bp
Anti-Sinn	CTCTTCATGACCTCGGATAGCCCA		
Primer Myogenin (Ragge, K. 1996)			
Sinn (FSY)	CAACCAGGAGGAGCGCGATCTCCG	465-1064	599bp
Anti-Sinn (FAY)	AGGCGCTGTGGGAGTTGCATTCACT		

2.9.2 Reverse-Transkriptase- (RT) Reaktion

Bei der RT-Reaktion transkribiert eine retrovirale RNA-abhängige DNA-Polymerase (Reverse Transkriptase) die aus den Zellen isolierte Gesamt-RNA in cDNA. Der für die Reaktion benötigte Startpunkt ist ein Poly-dT-Primer der unspezifisch das für Proteine charakteristische Poly-dA 3'-Ende bindet.

Zum Binden des Poly-dT-Primers an die mRNAs wurden 2µg Gesamt-RNA und 0,5µg p(dT)15 Primer in einem Volumen von 13µl für 5min auf 70°C erhitzt und anschließend für 10min auf Raumtemperatur abgekühlt. Die cDNA-Erststrangsynthese erfolgte nach Zugabe des RT-Mixes bei 42°C für 2h. Nach der Inkubationszeit wurde die Reaktion bei 2min 100°C gestoppt. Der Ansatz wurde anschließend mit 75µl bidest. Wasser verdünnt und 5µl für die nachfolgende PCR eingesetzt.

RT-Mix: 5µl 5x konzentriertem AMV-Puffer (250mM Tris-HCl, pH 8,3 bei 42°C; 250mM KCl; 50mM MgCl₂; 2,5mM Spermidin)

2,5µl DTT

2,5µl 10mM dNTP's

0,7µl [40U/µl] RNA'ase Inhibitor (RNA'sin) (25U gesamt)

0,65µl bidest. Wasser

0,65µl [23U/µl] AMV-RT (15U gesamt)

2.9.3 Polymerase-Ketten-Reaktion

Für den spezifischen Nachweis der Transinexpression wurden die designten Primer eingesetzt. Als Matrize für die Reaktion dienten cDNA's, welche aus der Gesamt-RNA von verschiedenen Zelltypen hergestellt wurden.

Für jeden PCR-Ansatz wurde die cDNA in den PCR-Reaktionsgefäßen vorgelegt und die weiteren Komponenten als Mix dazu pipettiert.

5µl cDNA

50pmol Sinn (5')-Primer

50pmol Anti-Sinn (3')-Primer

5µl 10mM NTP's

5µl 10x Reaktionpuffer

1,5mM MgCl₂

0,025U Taq-Polymerase

Bei einer größeren Anzahl von zu untersuchenden Proben, wurde die Hälfte des obigen Ansatzes eingesetzt.

2.9.4 PCR-Programm

Das Temperaturprogramm, welches während der Amplifizierung der DNA-Fragmente durchlaufen wird, ist von den jeweiligen Primerpaaren abhängig.

PCR-Programm:	Zyklen	Temperatur	Zeit
Vorabdenaturierung	1	94°C	2min.
Denaturierung		94°C	1min.
Annealing: p75 ^{NGFR}	30-35	68°C	1min
Transin1	30-35	70°C	1min.
Myogenin			
Extension		74°C	1min.
Extension	1	74°C	5min.
Kühlen	1	25°C	1min.

2.10 CAT-Test

Um die unterschiedlichen Möglichkeiten der p75^{NGFR}-Regulation untersuchen zu können, wurden CAT-Experimente durchgeführt. Hierfür standen unterschiedlich lange Promotor-Fragmente zur Verfügung, an deren 3'-Enden das bakterielle Enzym Chloramphenicol-Acetyl-Transferase (CAT) als Reportergen kloniert war (Metsis et al. 1992). Durch den Nachweis der Enzymaktivität läßt sich die Aktivierung des Gens durch die Promotor-Sequenz quantitativ bestimmen. Um ausschließen zu können, daß die gemessenen CAT-Werte aufgrund einer unterschiedlichen Transfektionseffizienz zustande kommen, wurden die CAT-Konstrukte mit einem konstitutiv exprimierenden (LacZ-) Konstrukt cotransfiziert, welches für das Enzym β -Galaktosidase kodiert. In einem photometrischen Test wurde die Intensität der β -Galaktosidase-Enzymreaktion gleich der Effizienz der Transfektion gesetzt und somit die einzelnen Proben auf einen einheitlichen β -Gal.-Wert abgeglichen.

2.10.1 Zellaufschluß

Die transfizierten Zellen wurden in der Kulturschale 2x mit PBS gewaschen, mit einem Gummispatel gelöst und in 1ml PBS aufgenommen. Die Zellen wurden für 2min in einer Eppendorfmikrozentrifuge sedimentiert, der Überstand dekantiert und die Zellen in 100µl 0,25M Tris-HCl suspendiert. Durch dreimaliges Einfrieren in Trockeneis, Auftauen und Vortexen wurden die Zellen aufgeschlossen und die unlöslichen Partikel durch fünfminütiges Zentrifugieren vom Zellextrakt getrennt. Der Überstand, der die zu untersuchenden Enzyme enthielt, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zur weiteren Untersuchung eingefroren.

2.10.2 β -Galaktosidase Farbttest

Um ein vergleichbares Niveau der einzelnen Proben zu erhalten, wurde die Transfektionseffizienz mit einem β -Galaktosidase-Farbttest bestimmt. Hierfür wurden 70µl Z-Puffer und 10µl des Substrats Chlorphenol-rot- β -D-Galaktopyranosid (CPRG, 50mM in bidest. H₂O) in einem 1,5ml Reaktionsgefäß vorgelegt. Die zu vermessenden Proben, 10µl Rohextrakt aus dem Zellaufschluß, wurden dazugegeben und durch kurzzeitiges Zentrifugieren und Inkubieren bei 37°C in einem Eppendorf-Thermoblock einheitlich gestartet. Nach 15min wurde die Reaktion mit 900µl 1M Natriumcarbonat (NaCO₃) gestoppt. Die durch das Enzym β -Galaktosidase bewirkte Rotfärbung der einzelnen Proben wurde bei 574nm am Photometer quantitativ bestimmt. Die erhaltenen β -Gal.-Werte ergaben den Verdünnungsfaktor der Rohextrakte für den CAT-Test, sofern sie einen Wert von mindestens 0,2 ergaben. Um eine übermäßige Reaktion im CAT-Test zu vermeiden, wurden alle Proben auf einen β -Gal.-Wert von 0,04 verdünnt bzw. abgeglichen.

2.10.3 Durchführung des CAT-Tests

Die einzelnen Zellextrakte wurden jeweils mit 0,25M Tris-HCl auf ein Volumen von 70µl gebracht.

Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 0,57M Acetyl-CoA und 5nCi D-Threo[dichloracety-1-¹⁴C]Chloramphenicol, sowie kurzem Zentrifugieren und Inkubieren bei 37°C gestartet. Nach 2h wurde die Reaktion mit 500µl Ethylacetat gestoppt und das Chloramphenicol sowie die entstandenen Derivate extrahiert. Der Überstand der Extraktion wurde in einer „Speedvac-Zentrifuge“ unter Anlegen eines Vakuums getrocknet und danach in 20µl Ethylacetat wieder gelöst. Die Proben wurden dann auf eine Dünnschichtchromatographie-Folie (DC-Alufolie, Kieselgel 60, Fa. Merck, Darmstadt) aufgetragen.

Die Auftrennung der durch die enzymatische Reaktion entstandenen, unterschiedlich acetylierten Chloramphenicol-Derivate erfolgte in einer geschlossenen Kammer mit einem Laufmittel aus Chloroform und Methanol im Verhältnis 19:1. Nach etwa 1h Laufzeit wurde die DC-Folie unter einem Abzug getrocknet und für 24 - 48h einem Röntgenfilm (Futji) exponiert.

2.11 Zymographie

Zum Nachweis, von ins Kulturmedium sezernierten Proteasen wurden deren Aktivität in Zymographien nachgewiesen. Beim Prinzip der Zymographie werden Proteasen inaktiviert (Zymogen), in einem Substratgel nach der molekularen Größe getrennt und wieder aktiviert. Der Nachweis der aktiven Protease erfolgt nach Anfärbung des nicht verdauten Substrats. Dort, wo die Protease aktiv war, entstehen entsprechend der Molekulargröße der Proteasen nicht gefärbte Bereiche. Da die Proteasen nur bestimmte Substrate verdauen können und die im GM enthaltenen Proteine sich als sehr störend erweisen, wurden die Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten in LH-Medium (DMEM + 0,2% (w/v) Laktalbumin Hydrolysat) überführt und für 24 - 48h weiter kultiviert.

Zur Stabilisierung der Proteasen wurde den abgenommenen Zellkulturüberständen 0,05% (w/v) Brij 35 (Polyoxyethylen-lauryl-ether, Sigma) Detergenz zugesetzt. 30µl Probe wurden dann mit 4x Ladepuffer (10% SDS, 4% Sacharose, 0,25M Tris-HCl, pH 6,8, 0,1% Bromphenol Blau) verdünnt, unter nicht denaturierenden Bedingungen auf ein 12%iges SDS-Substratgel (1mg/ml Gelatine oder Casein) geladen und bei 4°C separiert. Nach der Elektrophorese wurde das SDS in den Gelen durch 2x15min in 2,5% Triton X-100 herausgewaschen und die Gele in 50mM TrisHCl + 10mM CaCl über Nacht bei 37°C inkubiert.

Ergebnisse Teil I: Funktion

3 Ergebnisse Teil I: Funktion

Aufgrund des Expressionsmusters des $p75^{\text{NGFR}}$ liegt die Annahme nahe, daß der $p75^{\text{NGFR}}$ in die embryonale Muskelentwicklung involviert ist. Wie Radeva (1978) gezeigt hat, reagieren Myoblasten in Wassermolchembryonen auf eine abundante NGF-Applikation mit einer beschleunigten Differenzierung im Vergleich zu unbehandelten Embryonen. Um ausschließen zu können, daß es sich bei diesem NGF-Effekt auf die Muskelzellen um eine indirekte Wirkung handelt, die z.B. durch benachbarte NGF responsive Zellen ausgelöst wurde, ist es wichtig, eine Möglichkeit zu finden, den NGF-Effekt auf die Muskelzellen isoliert untersuchen zu können. Ein hierfür geeignetes Modellsystem sind etablierte Muskelzelllinien, an denen man unter kontrollierten Zellkulturbedingungen die einzelnen Schritte der Muskeldifferenzierung nachstellen und untersuchen kann.

3.1 Stabile $p75^{\text{NGFR}}$ -Überexpressionsklone als Modellsystem

Als erster Schritt zur Untersuchung der Funktion des $p75^{\text{NGFR}}$, wurde das Gen des $p75^{\text{NGFR}}$ in einen eukaryotischen Expressionsvektor kloniert, der durch seine MSV-LTR eine konstitutive Überexpression in eukaryotischen Zellen bewirkt. Da es zu Problemen bei der Einklonierung der $p75^{\text{NGFR}}$ -cDNA in den Vektor kam, wurde, wie bereits von Shooter festgestellt wurde (schriftliche Mitteilung), mit einem HindII-Verdau die cDNA im nicht kodierenden 3'-Bereich von 3400bp auf 2050bp verkürzt (Abb. 1).

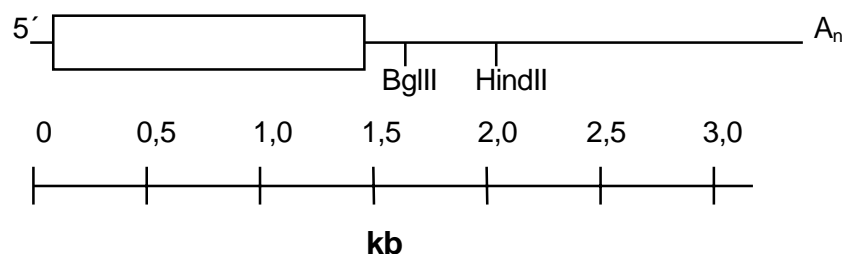


Abb. 1: Restriktionskarte der $p75^{\text{NGFR}}$ -cDNA (Radek et al. 1987).

Gezeigt sind der codierende Bereich und zwei Restriktionsschnittstellen der $p75^{\text{NGFR}}$ -cDNA. Nach einem HindII-Verdau wurde ein 2050bp großes Fragment für die weiteren Experimente verwendet.

Für das Experiment wurde die Maus-Myoblastenzelllinie C2C12 ausgewählt. Die C2C12-Zellen exprimieren keinen TrkA, den $p75^{\text{NGFR}}$ sehr schwach und zeigen nach erfolgter Differenzierung in Myotuben keine $p75^{\text{NGFR}}$ -Expression mehr, was der temporalen Expression in Rattenembryonen entspricht (Raivich et al. 1985; Heuer et al. 1990; Wheeler et al. 1992). Außerdem exprimieren die C2C12-Zellen funktionsfähiges NGF, was eine autokrine NGF/NGF-Rezeptor-Stimulation möglich macht.

Wie von Seidl (mündliche Mitteilung) schon zuvor gezeigt wurde, reagieren die C2C12-Zellen auf eine abundante NGF-Applikation mit einem etwas verstärkten Wachstum und einer beschleunigten Differenzierung im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Als Ursache für die beschleunigte Differenzierung wurde diskutiert, daß es durch das verstärkte Wachstum der NGF-behandelten C2C12 Zellen zu einer verfrühten Kontaktinhibition des Zellzyklus kommt, was die Differenzierung der Muskelzellen einleitet.

Die Überexpression des $p75^{\text{NGFR}}$ sollte die über den $p75^{\text{NGFR}}$ vermittelten Einfluß auf die C2C12-Zellen verstärken und damit deutlicher aufzeigen. Desweiteren ist es interessant zu verfolgen, wie sich die C2C12-Zellen verhalten, wenn das Gen des $p75^{\text{NGFR}}$ nicht mehr mit der Differenzierung der Zellen herunterreguliert werden kann.

Mit der Transfektion des die Anti-Sinn-Orientierung enthaltenden Vektors, sollte versucht werden, eine $p75^{\text{NGFR}}$ -Anti-Sinn-RNA in den Zellen zu exprimieren, welche sich an die in den C2C12-Zellen vorhandene $p75^{\text{NGFR}}$ -Sinn-RNA binden soll umso die Translation des $p75^{\text{NGFR}}$ -Proteins zu verhindern. Das Beenden der $p75^{\text{NGFR}}$ -Proteinbildung auf den Zellen wurde als zweite Möglichkeit der Funktionsuntersuchung gewählt, um die gewonnenen Ergebnisse besser interpretieren zu können.

Wie im Material- und Methodenteil beschrieben wurde, wurden C2C12-Zellen mit dem Sinn- und Anti-Sinn-Konstrukten des $p75^{\text{NGFR}}$ -Gens transfiziert. Die nach der G418-Selektion gewonnenen Sinn-Klone wurden zunächst auf ihre Überexpression des $p75^{\text{NGFR}}$ hin überprüft. Hierfür wurden die Klone immunhistochemisch mit einem spezifischen Antikörper (IgG1 192, Boehringer Mannheim) gegen den $p75^{\text{NGFR}}$ getestet (Abb. 2).

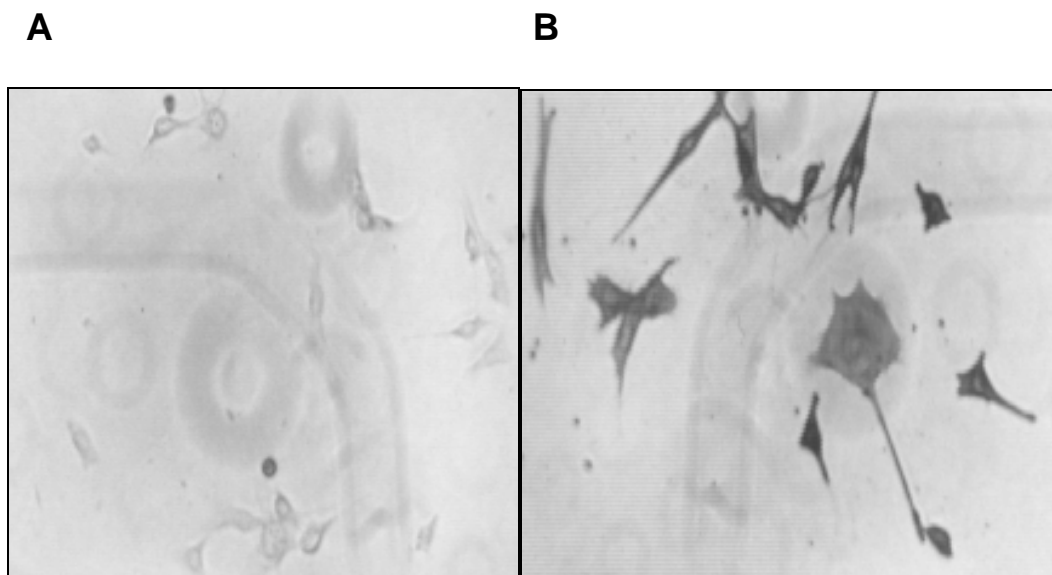


Abb. 2 : Nachweis des p75^{NGFR} auf parentalen C2C12-Zellen (A) und auf pEMSV-p75^{NGFR} stabiltransfizierten C2C12-Zellen (B).

Der dargestellte p75^{NGFR} exprimierende Klon wurde wie unter 2.7.5 beschrieben hergestellt. Die fixierten Zellen wurden mit einem p75^{NGFR} spezifischen Antikörper immunhistochemisch angefärbt (DAB-Färbung). Auf den parentalen C2C12-Zellen ist der p75^{NGFR} immunhistochemisch nicht nachweisbar (A). Auf den p75^{NGFR} überexprimierenden C2C12-Zellen hingegen ist eine spezifische Anfärbung zu beobachten.

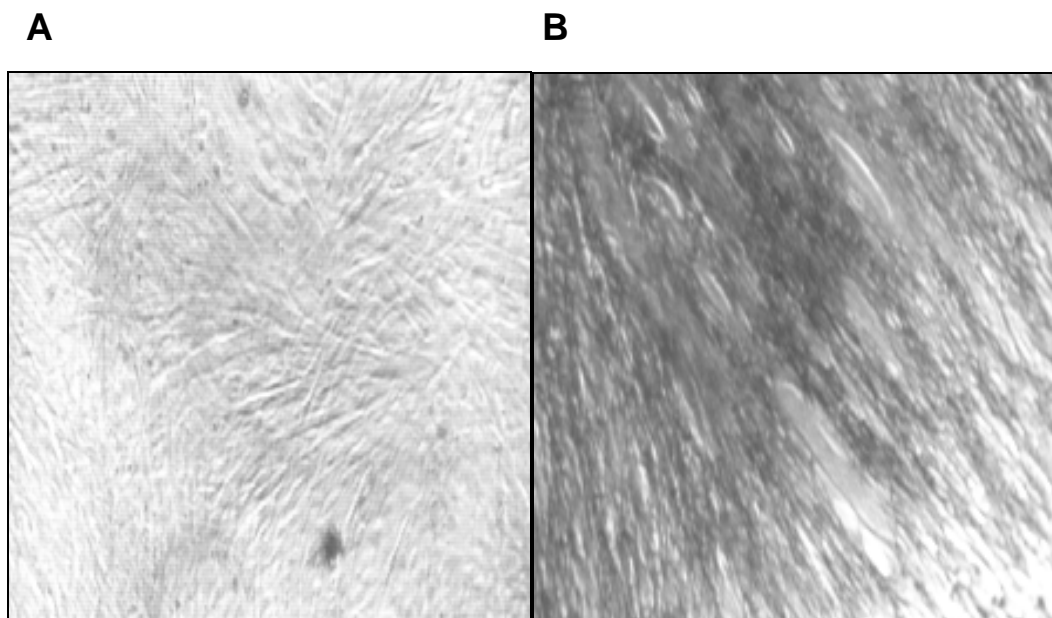


Abb. 3: Nachweis der konstitutiven p75^{NGFR}-Expression in den stabil-transfizierten C2C12-Zellen während der Kultivierung unter Differenzierungsbedingungen.

Die Zellen wurden wie in Abb. 2 mit einem spezifischen p75^{NGFR} Antikörper immunhistochemisch angefärbt. Auch unter Kulturbedingungen, die zur Differenzierung der C2C12-Zellen zu Myotuben führen, ist der p75^{NGFR} auf dem Überexpressionsklon zu detektieren (B).

Im Gegensatz zu den parentalen C2C12-Zellen zeigten die Zellen des dargestellten p75^{NGFR}-Überexpressions-Klons eine große Anzahl von Rezeptoren (Abb. 2B). Bei einer mit dem leeren Vektor transfizierten Zelle ist der p75^{NGFR} immunhistochemisch nicht nachweisbar (Abb. 2A). Damit ist gezeigt, daß die Überexpression des p75^{NGFR} in den C2C12-Zellen nicht auf den verwendeten Vektor oder das Transfektionsereignis zurückzuführen ist.

Nach der Differenzierung des p75^{NGFR}-Sinn-Klons in Myotuben kommt es im Vergleich zur parentalen C2C12-Zelllinie zu keiner Herunterregulierung der p75^{NGFR}-Expression, so daß die Rezeptoren auf den Myotuben immunhistochemisch deutlich nachweisbar sind (Abb. 3B).

Somit ist der Nachweis erbracht worden, daß das verwendete Expressionskonstrukt in den Zellen transkribiert und translatiert wird.

Die Expression der Anti-Sinn-RNA wurde in den C2C12-Klonen mittels Northernblot nachgewiesen (Abb. 4). Dies war möglich, weil die Expression des p75^{NGFR} in den C2C12-Zellen nur sehr schwach ist und eine verkürzte p75^{NGFR}-cDNA für die Expression in den Zellen verwendet wurde.

Unter ca. 70 getesteten Klonen wurde ein Klon gefunden, der eine deutliche Expression der erwarteten 2050bp großen mRNA enthielt.

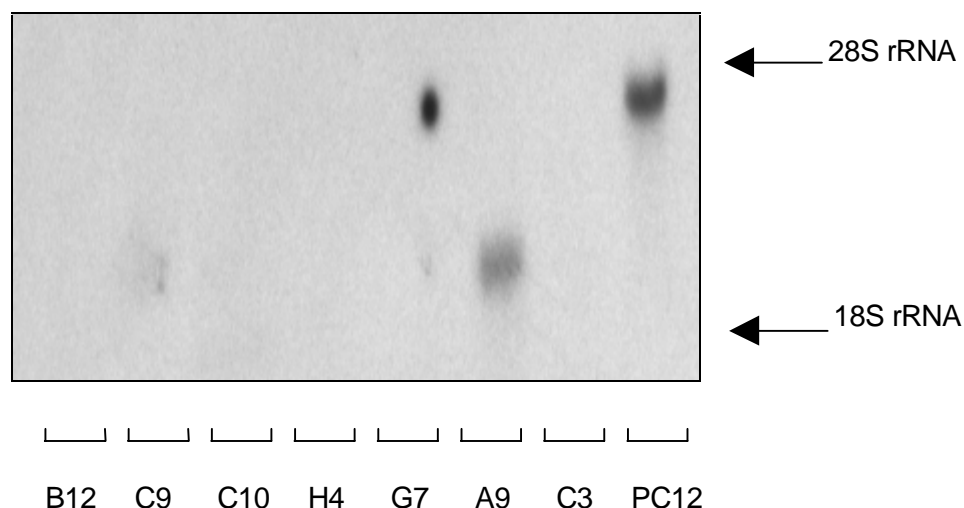


Abb. 4: Detektion des C2C12-p75^{NGFR}-Anti-Sinn-Klons.

Die C2C12-Zellen wurden mit 20µg pEMSV bzw. 20µg pEMSV-p75^{NGFR}-Anti-Sinn und 1µg pKl^{neoSal} cotransfiziert. Die Anti-Sinn-Transkripte wurden mittels Northernhybridisierung nachgewiesen. RNA von PC12 Zellen diente als Positivkontrolle (PC12). Es konnte ein Anti-Sinn exprimierender Klon (2050bp) isoliert werden (A9). Die bei Klon G7 gezeigte Markierung, ist eine unspezifische Hintergrundfärbung.

Bei einer vorläufigen immunhistochemischen Charakterisierung der Sinn-Klone und des Anti-Sinn-Klons auf eine Expression des muskelspezifischen Intermediärfilamentproteins Desmin und der schweren Kette des Myosinmoleküls (MHC) fiel auf, daß in den Zellen des Anti-Sinn-Klons weder Desmin im undifferenzierten Zustand noch das MHC-Molekül unter Differenzierungsbedingungen nachzuweisen war. Um zu überprüfen, ob dieses Erscheinungsbild des Anti-Sinn-Klons auf die exprimierte Anti-Sinn-mRNA zurückzuführen ist, wurden die Zellen mit dem p75^{NGFR}-Sinn-Konstrukt transfiziert, in der Hoffnung, daß dieses die Anti-Sinn-RNA überkommen würde und es dadurch zu einem nachweisbaren Rezeptorprotein auf der Zelloberfläche kommt.

Die erneute Expression des p75^{NGFR} auf den Zellen (Abb. 5) sollte zeigen, ob damit die beobachteten Effekte des Anti-Sinn-Klons aufgehoben werden können und es somit wieder zu einer Expression von Desmin oder MHC kommt.

Um eine weitere Selektion über eine andere Antibiotikaresistenz zu vermeiden, wurden die p75^{NGFR}-positiven Zellen, wie im Material- und Methoden-Teil unter 2.8.1 beschrieben wurde, lebend markiert. Es wurde ein Klon isoliert der den p75^{NGFR} deutlich exprimierte und für die weiteren Experimente verwendet.

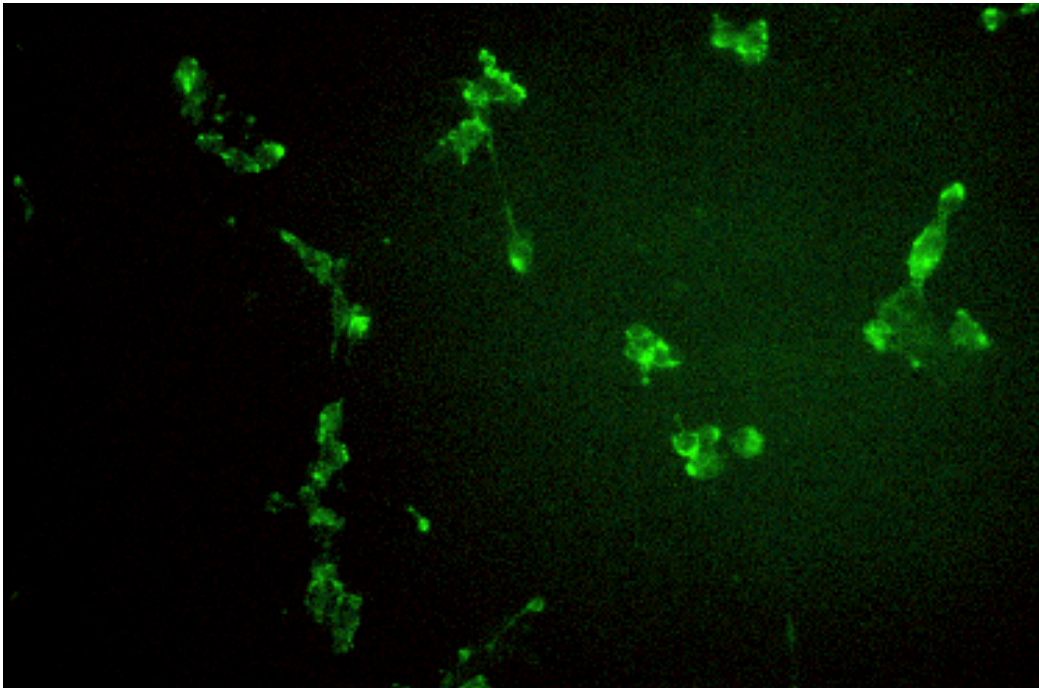


Abb. 5: p75^{NGFR}-Überexpressionsklon nach Immunfluoreszenzmarkierung.

Die Zellen des p75^{NGFR}-Anti-Sinn-Klons (A9) wurden mit 20µg pEMSV-p75^{NGFR}-Sinn-Orientierung transfiziert. Zur Identifizierung von p75^{NGFR} überexprimierenden Zellen wurden C2C12-Zellen (A9), wie unter 2.8.1 beschrieben, lebend immunfluoreszenzmarkiert. Gezeigt sind mehrere markierte Zellen in der Zellkulturschale, die den p75^{NGFR} auf ihrer Oberfläche exprimieren.

3.2 Charakterisierung der Zellen

Nach den erbrachten Vorleistungen, wie der Herstellung der Überexpressionsklone und des Anti-Sinn-Klons, wurden nun in verschiedenen Untersuchungen die einzelnen Zell-Klone mit der Urprungs-C2C12-Zelllinie verglichen. Die daraus resultierenden Ergebnisse sollten den $p75^{\text{NGFR}}$ -spezifischen Einfluß auf Muskelzellen verdeutlichen und einen Hinweis auf dessen Funktion außerhalb von neuronalen Zellen geben.

3.2.1 Immunhistochemischer Vergleich der Zelllinien

Begonnen wurden die vergleichenden Studien mit einer immunhistochemischen Anfärbung der Proteine für Desmin und der schweren Kette des Myosins (MHC), wobei die Anfärbung des MHC-Proteins gleichzeitig eine Aussage über den Differenzierungszustand der Zellen geben sollte.

Für das Experiment wurden zwei $p75^{\text{NGFR}}$ -Überexpressionsklone verwendet. Um eine völlige Unabhängigkeit der beiden Klone zu garantieren, wurde ein Klon nach der G418-Selektion (Klon1) ausgewählt, und der als Klon2 bezeichnete $p75^{\text{NGFR}}$ -Überexpressionsklon, der mit der Immunfluoreszenzmethode aus dem Anti-Sinn-Klon gewonnen wurde, verwendet. Außerdem wurde der Anti-Sinn-Klon und die ursprünglichen, nicht transfizierten C2C12-Zellen eingesetzt.

Die Zellen wurden in 8 Näpfe zu 1000 Zellen pro Napf einer Mikrotiter-Zellkulturplatte (Napf Ø 6mm) in 100µl GM ausgesät. Für jeden Versuchstag wurde eine Mikrotiter-Zellkulturplatte vorbereitet. Der Versuch dauerte 6 Tage, wobei täglich eine Platte zur Bestimmung der Zellzahl und zur immunhistochemischen Anfärbung fixiert wurde. Das Medium wurde während dieser Zeit täglich gegen frisches GM ausgetauscht.

3.2.1.1 Bestimmung des Wachstums der unterschiedlichen Zellklone

Die Auswertung des Experiments begann mit der Feststellung des Wachstums der einzelnen Zellklone. Dies ist eine wichtige Voraussetzung für die spätere Erhebung der Differenzierungsrate, denn die kultivierte C2C12-Zelllinie beendet bei Zell-Zell-Kontakt ihre Teilungsaktivitäten und bildet differenzierte Myotuben aus.

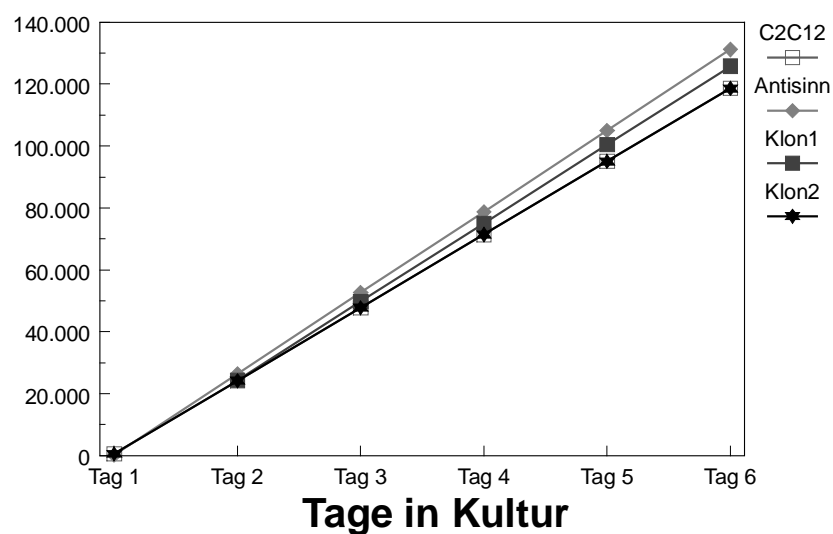


Abb. 6: Bestimmung des Zellwachstums der vier unterschiedlichen C2C12-Klone.

Während der sechs Tage des Experimentes wurde täglich die Zellzahl pro Napf bestimmt. Für einen besseren Vergleich wurde das Wachstum der Klone in Form einer linearen Regression aufgetragen. Dargestellt wurden die durchschnittlichen Zellzahlen aus $n=8$ Näpfen, \pm SEM (nicht dargestellt). Gezeigt ist das verhältnismäßig gleiche Wachstum der vier verschiedenen Klone.

Die eingesetzten Zellen unterschieden sich nicht signifikant in ihrem Wachstum, weshalb alle Zellen als gleich schnell wachsend angesehen wurden.

3.2.1.2 Bestimmung des Anteils der Desmin-positiven Zellen.

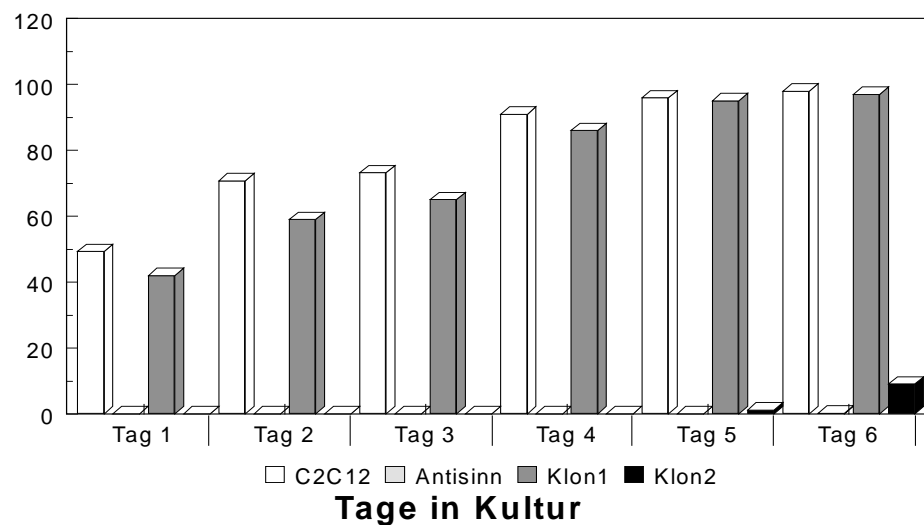


Abb. 7: Prozentualer Anteil der Desmin-positiven Zellen an der Gesamtzellzahl

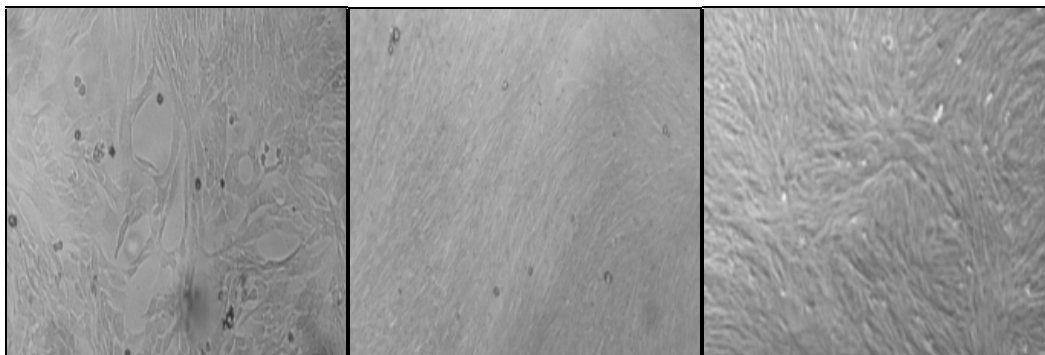
Die Zellen wurden während der Dauer des Experimentes täglich fixiert und der Anteil an Desmin-positiven Zellen zwischen den vier verschiedenen Klonen verglichen. Gezeigt sind die durchschnittlichen prozentualen Anteile der Desmin-positiven Zellen aus $n=8$ Näpfen, \pm SEM wurde wegen zu geringer Abweichungen nicht dargestellt. Der Klon 2 exprimiert nur in Myotuben Desmin.

Die immunchemische Anfärbung des muskelspezifischen Intermediärfilamentproteins Desmin zeigte bei der unbehandelten C2C12-Zelle und dem Überexpressionsklon1, daß etwa 50% der Zellen zu Beginn des Experiments Desmin und über 90% nach 6 Tagen in Kultur exprimieren (Abb. 7). Es konnte kein Unterschied in der Expression von Desmin zwischen dem Überexpressionsklon1 und den parental C2C12-Zellen festgestellt werden. Bei dem Anti-Sinn-Klon hingegen kam es zu einer völligen Blockierung der Desmin-Expression, die durch die $p75^{NGFR}$ -Überexpression in subkonfluenten Zellen nicht vollständig wieder hergestellt wurde, jedoch in Myotuben von differenzierten Zellen des Überexpressionsklon2 nachzuweisen war (Abb.7, Klon2, Tag 6). Dies deutet darauf hin, daß der $p75^{NGFR}$ in C2C12-Myoblasten an Differenzierungsprozessen beteiligt ist.

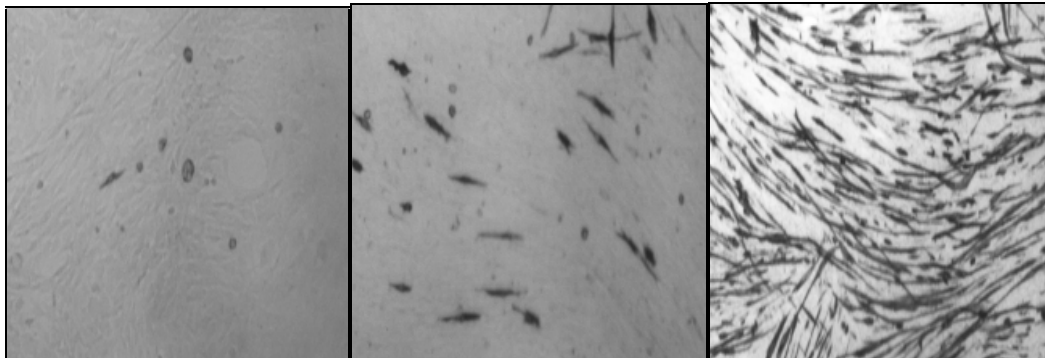
3.2.1.3 Bestimmung des Grades der Zelldifferenzierung



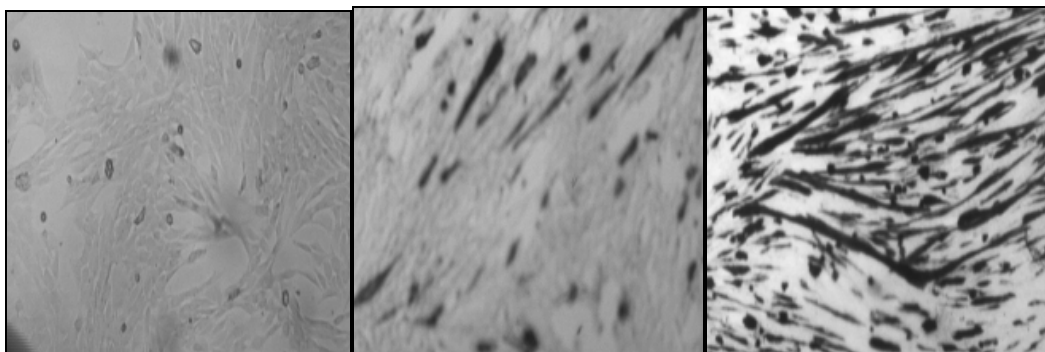
Parentale C2C12-Zellen



Anti-Sinn-Klon



p75^{NGFR}-Überexpressionsklon1



p75^{NGFR}-Überexpressionsklon 2

Legende siehe nächste Seite

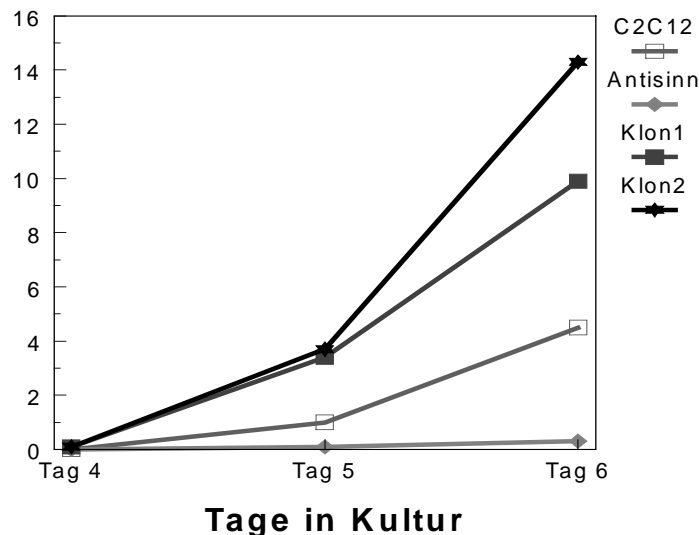
Tag 4

Tag 5

Tag 6

Abb. 8: Immunhistochemische Anfärbung des MHC.

Der Anteil der differenzierten Zellen wurde bestimmt über die Anzahl der MHC-positiven Zellen relativ zur Gesamtzellzahl. Hierfür wurde die schwere Kette des Myosin-Moleküls (MHC) immunhistochemisch angefärbt (DAB) und nur Zellkerne der MHC-positiven Zellen gezählt.

**Abb. 9: Prozentualer Anteil der MHC-positiven Zellen an der Gesamtzellzahl.**

Die Zellen wurden in Mikrotiterzellkulturplatten zu 2000 Zellen pro Napf ausplattiert. Das GM wurde täglich gewechselt. An jedem Tag des Experiments wurde eine Zellkulturplatte fixiert und die MHC positiven Zellen immunhistochemisch detektiert. $n=8$; \pm SEM wurde wegen der geringfügigen Abweichungen nicht dargestellt. Beide $p75^{\text{NGFR}}$ -Überexpressionsklone zeigen eine beschleunigte Differenzierung.

Wie aus der Abb. 9 zu entnehmen ist, treten bei den parentalen C2C12-Zellen am Tag 5 der Kultur in GM erste MHC-positive Zellen mit einem Anteil von 0,1 % auf was sich am Tag 6 in Kultur auf 4,5% steigert.

Der Anti-Sinn-Klon hingegen zeigt bis auf einige wenige Zellen keine immunhistochemische MHC-Anfärbung und war nicht mehr fähig in Myotuben zu differenzieren. Bei dem Überexpressionsklon2, welcher nach einer $p75^{\text{NGFR}}$ Transfektion des Anti-Sinn-Klon gewonnen wurde, konnten wieder MHC-positive Myotuben nachgewiesen werden.

Im Vergleich zu den parentalen C2C12 Muskelzellen lassen sich in den beiden $p75^{\text{NGFR}}$ -Überexpressionsklonen 1 und 2 schon am vierten Tag in Kultur MHC-positive Zellen nachweisen, also einen Tag vor den parentalen C2C12-Zellen. Außerdem zeigen die

Überexpressionsklone am Tag 6 in Kultur doppelt (Klon1: 9,9%) bis dreimal (Klon2: 14,3%) so viele MHC-positive Zellen als die parentalen C2C12-Zellen.

An dieser Stelle soll bereits darauf hingewiesen werden, daß das für die Reaktion des $p75^{NGFR}$ erforderliche NGF innerhalb der ersten drei Tage von den Zellen selbst produziert und mit dem Konfluentwachsen der Zellen nicht mehr exprimiert wurde (siehe Abb. 10).

Aus dem Experiment ergibt sich, daß zwei völlig unabhängige $p75^{NGFR}$ überexprimierende Zellklone bei einer ähnlichen Wachstumsrate sehr viel schneller in die Differenzierung gehen als C2C12-Zellen die den $p75^{NGFR}$ nicht überexprimieren. Weiterhin ist zu bemerken, daß ein C2C12-Zellklon, der eine $p75^{NGFR}$ -Anti-Sinn-mRNA exprimiert, nicht mehr in der Lage ist zu differenzieren. Wenn man hingegen in Zellen dieses Klons den $p75^{NGFR}$ wiederum überexprimiert, behalten die Zellen zwar einen Teil ihres Phänotyps bei, (siehe die nicht vorhandene frühe Desmin-Expression), differenzieren aber wieder zu Myotuben. Dies zeigt, daß die beobachteten Veränderungen des $p75^{NGFR}$ -Anti-Sinn exprimierenden Klons spezifisch sind, da sie fast vollständig durch die $p75^{NGFR}$ -Überexpression wieder aufgehoben werden können. Außerdem deuten die Ergebnisse ebenfalls darauf hin, daß der $p75^{NGFR}$ in die Differenzierungsprozesse der C2C12-Myoblasten mit involviert ist.

3.2.2 Expression der bHLH-Transkriptionsfaktoren in den vier Zelllinien

Nach der immunhistochemischen Charakterisierung der verschiedenen Klone wurde die Expression der vier myogenen bHLH-Transkriptionsfaktoren untersucht. Hierbei sollte überprüft werden, ob die vier Zelllinien sich in der Expression dieser Transkriptionsfaktoren unterscheiden. Nach den obigen Ergebnissen wäre dies zu erwarten.

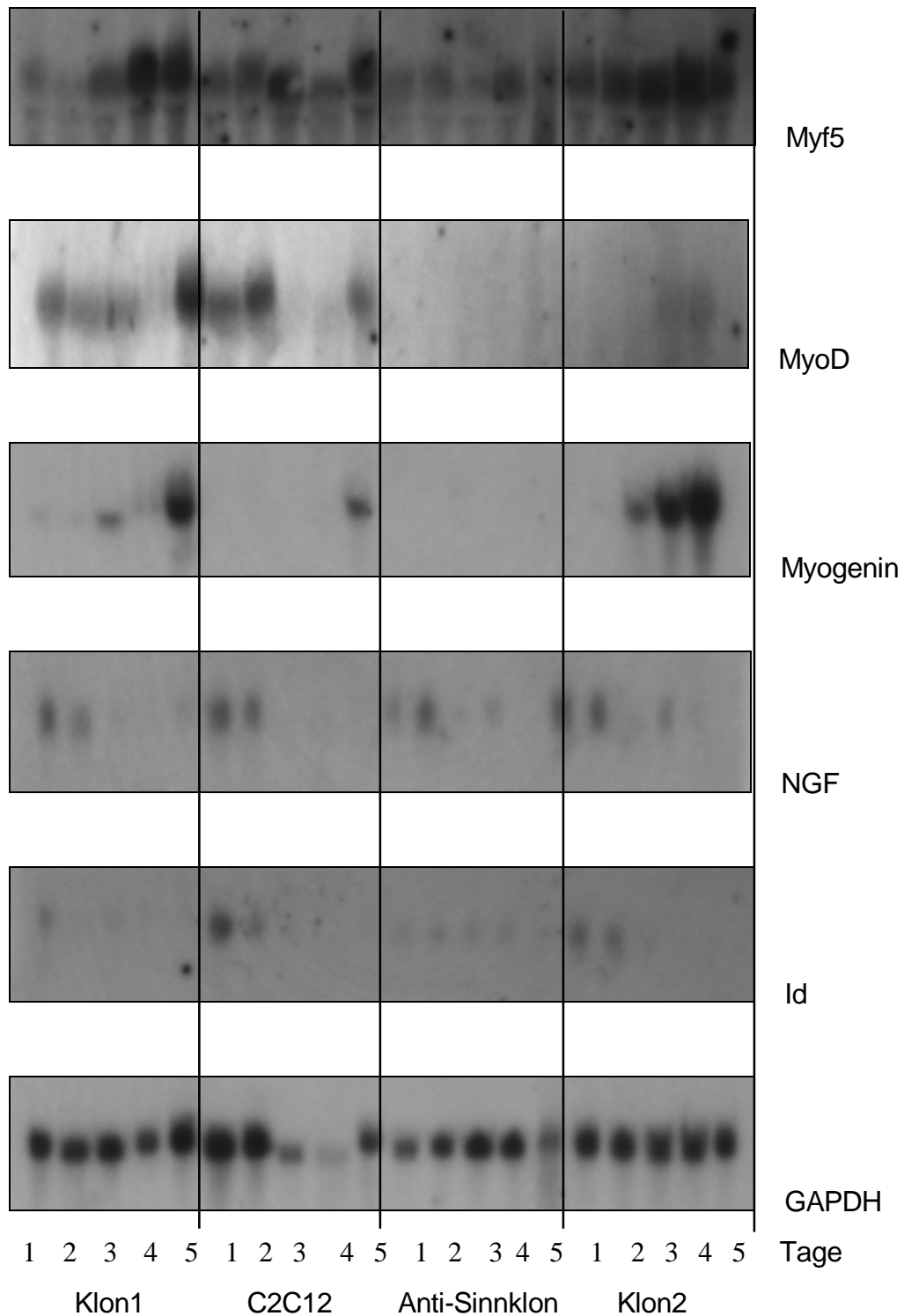


Abb. 10: Expressionsverlauf einiger ausgewählter Gene während der Kultivierung der vier Zellklone

Die Zellen wurden fünf Tage lang in GM kultiviert und täglich ein Teil zur RNA-Isolation verwendet. Die Darstellung der GAP-DH-Expression diente der quantitativen Bestimmung der aufgetragenen RNA. Gezeigt ist der zeitliche Verlauf der Expression der bezeichneten Gene innerhalb der ersten fünf Tage in Kultur (Erklärung siehe Text).

Die abgebildeten Northernblots (Abb. 10) zeigen, daß alle Zelllinien vom ersten Tag an Myf5 exprimieren.

Bei den parentalen C2C12-Zellen und dem p75^{NGFR}-Überexpressionsklon1 wird MyoD ebenfalls vom ersten Tag an exprimiert. Der Anti-Sinn und der daraus isolierte p75^{NGFR} überexprimierende Klon2 zeigen am ersten Tag keine MyoD-Expression. Auch während der weiteren Tage in Kultur kommt es beim Anti-Sinn-Klon zu keiner MyoD-Expression. Bei dem Überexpressionsklon2 läßt sich hingegen erst ab dem zweiten bis dritten Tag in Kultur, nach der Beendigung der NGF-Expression, MyoD nachweisen.

Wie nach den Ergebnissen der immunhistochemischen Untersuchungen zu erwarten war, ist eine Myogenin-Expression in den unbehandelten C2C12-Zellen erst am fünften Tag der Kultivierung nachzuweisen. Bei den beiden p75^{NGFR}-Überexpressionsklonen kommt es jedoch schon am dritten Tag in Kultur zu einer ersten Myogenin-Expression, die in den darauffolgenden Tagen stark ansteigt.

Der Anti-Sinn-Klon zeigt keine Myogenin-Expression.

Wie schon die obigen Untersuchungen gezeigt hatten, bestätigt die Northernblotanalyse diese Ergebnisse, und zeigt, daß Gene, die am Fortschreiten der Myogenese beteiligt sind, wie z.B. Myogenin, in den beiden p75^{NGFR}-Überexpressionsklonen deutlich eher exprimiert werden als in der parentalen C2C12-Zelle.

Zusammenfassung: Nach der Transfektion des verwendeten $p75^{\text{NGFR}}$ -Expressionskonstruktes mit der Sinn-Orientierung, läßt sich der Rezeptor bei C2C12-Zellklonen mit einem spezifischen Antikörper auf der Zelloberfläche detektieren. Nach der Transfektion mit dem $p75^{\text{NGFR}}$ -Anti-Sinn Konstrukt, wurde in einem Klon eine ca. 2kb große, $p75^{\text{NGFR}}$ -spezifische RNA nachgewiesen, welche der Anti-Sinn-Expression entspricht. Der Vergleich der zwei Überexpressionsklone und des Anti-Sinn Klons mit den parentalen C2C12-Zellen zeigte, daß der $p75^{\text{NGFR}}$ -Anti-Sinn exprimierende Klon nicht mehr zu Myotuben differenziert und kein Desmin oder MHC nachweisbar ist. Außer Myf5 expremiert der $p75^{\text{NGFR}}$ -Anti-Sinn Klon keinen weiteren bHLH-Transkriptionsfaktor. Die Aufhebung der $p75^{\text{NGFR}}$ -Anti-Sinn-Expression durch ein Überexprimieren des $p75^{\text{NGFR}}$ in diesen Zellen führte dazu, daß die Zellen wieder zu Myotuben differenzierten, MyoD expremierten und auch Desmin wieder nachweisbar war, jedoch nur in differenzierten Myotuben. Die durch die Expression des $p75^{\text{NGFR}}$ verursachten Veränderungen in den C2C12-Zellen wurden somit fast vollständig durch die $p75^{\text{NGFR}}$ -Überexpression behoben (Rescue). Den beiden $p75^{\text{NGFR}}$ -Überexpressionsklonen war eine beschleunigte Differenzierung gemeinsam, die durch den immunhistochemischen Nachweis von MHC und der Myogenin-Expression dokumentiert wurde. Diese Ergebnisse vermitteln den Eindruck, daß der $p75^{\text{NGFR}}$ in die Differenzierungsprozesse von C2C12-Myoblasten involviert ist.

3.3 Metalloproteinasen

Eine weitere Möglichkeit, eine $p75^{\text{NGFR}}$ regulierte Funktion in Muskelzellen nachzuweisen, war die Überprüfung der Regulation von sezernierten Metalloproteinasen. Die Grundlage für diese Annahme bildeten Arbeiten, in denen gezeigt wurde, daß NGF in einer Melanoma-Zelllinie, die ausschließlich den $p75^{\text{NGFR}}$ exprimiert, eine 72kDa große Collagenase induziert (Herrmann et al. 1993). Desweiteren wurde gezeigt, daß NGF in PC12-Zellen die Metalloproteinase Transin1 (Stromelysin; MMP3) aktivieren kann (Machida et al. 1989).

An der Differenzierung von Muskelzellen, in deren Verlauf die einzelnen Myoblasten zu mehrkernigen Myotuben fusionieren, sind eine ganze Reihe von Metalloproteinasen beteiligt, deren Überexpression zu einer deutlichen Beschleunigung der Myotubenbildung führt (Couch et al. 1983; Yagami-Hiromasa et al. 1995).

Aufgrund der ähnlichen Effekte, die die Überexpression von Metalloproteinasen und die des $p75^{\text{NGFR}}$ haben, wurde überprüft, ob die Überexpression des $p75^{\text{NGFR}}$ zu einer Veränderung des Spektrums von sezernierten Metalloproteinasen führt. Zum Nachweis dieser Metalloproteinasen wurden Zymographien durchgeführt.

Für das Experiment wurde zusätzlich zu den C2C12-Zellen und dem $p75^{\text{NGFR}}$ -Überexpressionsklon1 eine weitere Ratten-Myoblastenzelllinie (L6), welche zuvor auf NGF- und $p75^{\text{NGFR}}$ -Expression im Northernblot hin überprüft wurde, verwendet.

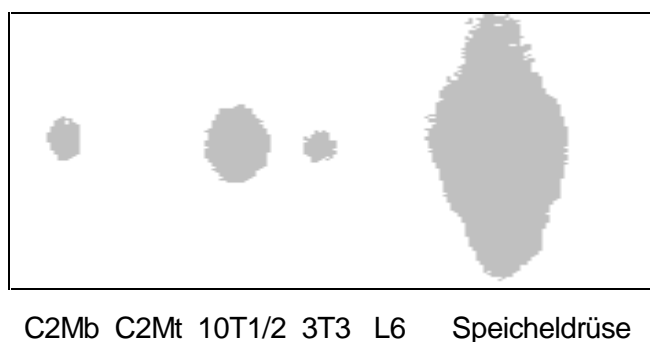


Abb. 11: Feststellung der NGF-Expression in verschiedenen Zelllinien.

C2C12-Myoblasten (C2Mb); C2C12-Myotuben (C2Mt); C3H10T1/2 (10T1/2); NIH 3T3 (3T3); L6-Myoblasten (L6); RNA aus der Speicheldrüse einer männlichen Maus. Alle RNAs stammen aus einer subkonfluenten Kulturführung. Gezeigt ist eine Northernhybridisierung mit einer NGF-Gensonde. Die Speicheldrüsen-RNA diente als Positivkontrolle. Besonders auffällig ist, daß L6-Zellen kein NGF exprimieren.

Wie schon zuvor in den C2C12-Zellen gezeigt wurde, exprimieren die L6-Zellen ebenfalls den $p75^{\text{NGFR}}$ (siehe Abb. 17). Im Gegensatz zu den 10T1/2- und C2C12-Zellen, lassen sich bei den L6-Zellen keine NGF-Transkripte nachweisen (Abb. 11). Dieses Ergebnis macht die L6-Zelle zu einem sehr gut geeigneten Untersuchungsobjekt für den Einfluß von NGF auf die Zellen, da die in den Experimenten eingesetzte NGF-Konzentration genau bestimmt werden kann, und es zu keinen autokrinen Effekten kommt.

In den Zymographien wurden verschiedene Zelllinien auf ihre Metalloproteinase-Sezernierung hin mit einander verglichen.

Um einen zeitlichen Verlauf der Proteinase-Sezernierung innerhalb der Myogenese bzw. zu einem Zeitpunkt, während dem die Zellen auch den $p75^{\text{NGFR}}$ exprimieren, verfolgen zu können, wurden die Zellen mit einer sehr geringen Zellzahl ausgesät und danach bis zur Bildung der differenzierten Myotuben weiter kultiviert. Hierfür wurden 10.000 Zellen pro Napf einer Multiwell-Zellkulturplatte mit 1cm \times plattiert. Die Zellen wurden bis zur Konfluenz in GM kultiviert und ab diesem Zeitpunkt in DM bis zur Bildung von Myotuben weiter inkubiert. Für das Experiment wurden Zelllinien verwendet, die den $p75^{\text{NGFR}}$ exprimieren und Zellen, in denen die Expression nicht nachzuweisen war. Die Zellen wurden ohne Zugabe von NGF und mit der Zugabe von NGF kultiviert.

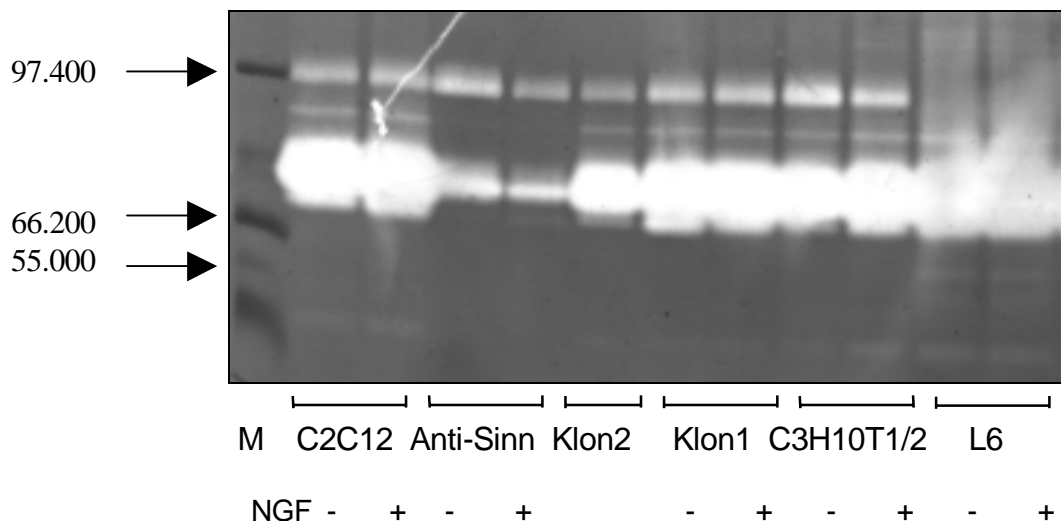


Abb. 12: Zymographie verschiedener Zelllinien. Vergleich zwischen NGF behandelten und nicht behandelten Zellen.

Die Zellen wurden mit und ohne Zugabe von 50ng/ml NGF kultiviert und zu den jeweiligen Zeitpunkten das GM bzw. DM gegen LH-Medium für 48h ausgetauscht, welches in den entsprechenden Näpfen ebenfalls 50ng/ml NGF enthielt (M = midweight Marker). L6-Zellen sezernieren keine 92kDa große Proteinase.

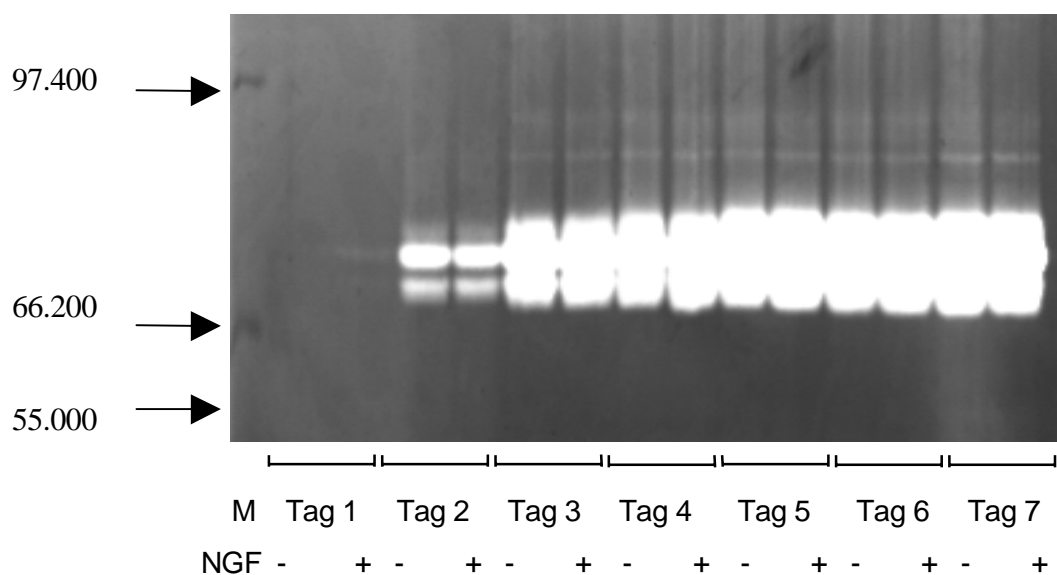


Abb. 13: Zymographie von L6-Zellen mit zunehmender Kultivierungsdauer und NGF-Zugabe

Die L6-Zellen wurden wie im vorherigen Versuch kultiviert und die Zellen entweder mit bzw. ohne 50ng/ml NGF-Zugabe kultiviert (M = midweight Marker). Erklärung siehe Text.

Die Zymographien zeigen keinen Unterschied der sezernierten Proteinase zwischen den NGF behandelten Zellen und den nicht behandelten Zellen (Abb. 12 / Abb. 13). Es kann kein Unterschied im Zymogramm zwischen den Fibroblasten CH310T1/2, die

keinen p75^{NGFR} exprimieren, und der Myoblasten-Zelllinie C2C12 beobachtet werden (Abb. 13). Die beiden Myoblasten-Zelllinien C2C12 und L6 unterscheiden sich hingegen in einer ca.100KDa großen Proteinase, die von den C2C12-Zellen sezerniert werden, jedoch von den L6-Myoblasten nicht.

3.3.1 Exprimieren Muskelzellen die Metalloproteinase Transin?

Um auch sehr geringe Unterschiede in der Expression der Proteinase zu überprüfen, wurden die verschiedenen Zelllinien auf die NGF und FGF induzierbare Matrix Metalloproteinase Transin mittels RT-PCR getestet. Der Primer nicht nur durch eine einzelne Bande, sondern auch durch einen Anstieg der Transin-RNA dokumentiert wird.

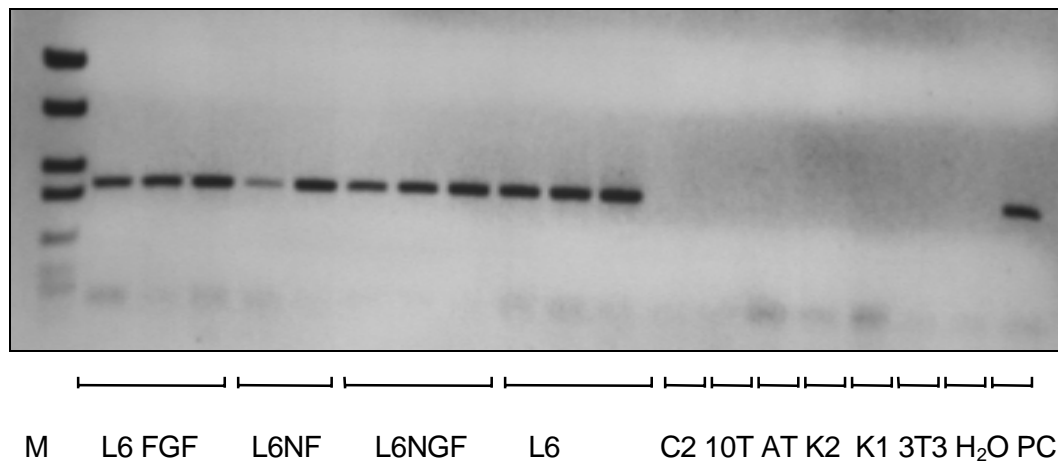


Abb. 14: Untersuchung auf eine Transin1 Expression in verschiedenen Zelllinien

Die L6-Zellen wurden subkonfluent ausplattiert und mit 10ng/ml FGF (L6 FGF) oder 50ng/ml NGF + 10ng/ml FGF (L6 NF) bzw. 50ng/ml NGF für 24h inkubiert. Außerdem wurden die Zellen C2C12 (C2), C3H10T1/2 (10T), Anti-Sinn-Klon (AT), Klon1 (K1), Klon2 (K2), NIH 3T3 (3T3) auf eine Transin-Expression hin untersucht. Als Positivkontrolle wurde RNA von NGF behandelten PC12-Zellen (PC) verwendet. Marker (pBR 322/Hapall). Nur die L6 Myoblasten haben eine Transin-Expression, welche durch die getesteten Faktoren nicht zu beeinflussen ist.

Im Gegensatz zu den 10T1/2- und C2C12-Zellen, exprimieren die L6-Zellen Transin (Abb. 14). Es konnte jedoch keine Abhängigkeit zwischen der Transin-Expression und der NGF- bzw. FGF-2-Zugabe gefunden werden (Abb. 14). Somit ist mit den eingesetzten Untersuchungsmethoden keine NGF induzierte Veränderung des Expressionsspektrums der Metalloproteinase nachzuweisen.

Zusammenfassung: Die parentalen C2C12-Zellen zeigen keinen Unterschied in ihrem Spektrum von sezernierten Metalloproteinasen im Vergleich zu den beiden p75^{NGFR} Überexpressionsklonen und der Fibroblastenzelllinie C3H10T1/2. Bei dem p75^{NGFR} Anti-Sinn exprimierende Klon konnten zwar die gleichen Proteinasen wie in den parentalen C2C12-Zellen nachgewiesen werden, aber in einer deutlich geringeren Konzentration.

Im Gegensatz zu den anderen untersuchten Zelllinien, wird von der Muskelzelllinie L6 eine ca. 100kDa große Metalloproteinase nicht sezerniert. Außerdem wird nur von der L6 Zelllinie die Metalloproteinase Transin in subkonfluenten Zellen exprimiert. Die in Melanoma Zellen beobachtete Induktion von Metalloproteinasen (Herrmann et al. 1993) konnte in den beiden Muskelzelllinien L6 und C2C12 nicht nachgewiesen werden

Ergebnisse Teil II: Regulation

4 Ergebnisse Teil II: Regulation

4.1 Regulation des $p75^{\text{NGFR}}$ -Gens: Einfluß von Zelldichte und FGF-2

Die Ergebnisse der Überexpression des $p75^{\text{NGFR}}$ in der C2C12-Myoblastenzelllinie deuten auf eine Involvierung dieses Rezeptors in die Differenzierungsprozesse der Muskelentwicklung hin. Es ergibt sich daher die Frage nach den Regulationsmechanismen innerhalb der Muskeldifferenzierung, die die $p75^{\text{NGFR}}$ -Genexpression beeinflussen.

Zunächst wurde die Expression des $p75^{\text{NGFR}}$ bei den Zelllinien C2C12 und L6 näher charakterisiert. Wie bereits in der Einleitung beschrieben wurde, exprimieren Myoblasten den $p75^{\text{NGFR}}$ *in vitro* und *in vivo*. In differenzierten Zellkulturen bzw. auf Muskelfasern ist keine $p75^{\text{NGFR}}$ -Expression nachzuweisen. Im Rindertestis konnte gezeigt werden, daß in A-Spermatogonien und I-Spermatogonien nur die Zellen den $p75^{\text{NGFR}}$ exprimieren, die sich im Zellzyklus befinden, und zwar vornehmlich in der G1-Phase (Wrobel et al. 1996). Ein weiterer Hinweis für den Zusammenhang zwischen der $p75^{\text{NGFR}}$ -Expression und des Zellzyklus ist, daß der mitogene Faktor FGF-2 die $p75^{\text{NGFR}}$ -Promotor-Aktivität in der humanen Neuroblastomazelllinie CHP100 verstärkt (Taiji et al. 1992)

Daraufhin wurde die Abhängigkeit der $p75^{\text{NGFR}}$ -Expression von der Zellzyklus bzw. der Zelldichte in der C2C12- und L6-Myoblastenzelllinie untersucht und der Einfluß von FGF-2 auf die $p75^{\text{NGFR}}$ -Expression verfolgt.

Als Voraussetzung für die Untersuchung des Einflusses von FGF-2 auf die Zellen, wurde die Expression des FGF-Rezeptors 1, an den FGF-2 bindet (Green et al. 1996) und des FGF-2 Proteins untersucht. Diese Arbeit wurde in Zusammenarbeit mit C. Meisinger und C. Grothe (Institut für Anatomie, Universität Freiburg) durchgeführt.



Aus Abb. 15 ist zu entnehmen, daß beide Zelllinien FGF-2 exprimieren, jedoch nur die C2C12-Zellen eine nachweisbare FGFR-1 Expression haben. Bei den L6-Myoblasten hingegen konnte keine FGFR-1 Expression nachgewiesen werden, was den Ergebnissen von Moore et al. (1991) über die L6-Zellen entspricht.

Beide Zelllinien wurden in großen 15cm Ø Zellkulturschalen in GM kultiviert und ab einer Zelldichte von 50% Konfluenz auf neue Zellkulturschalen 1:4 verteilt. Für das Experiment wurden die beiden Zelllinien C2C12 und L6 in 10cm Ø Kulturschalen mit unterschiedlichen Zellzahlen von 0,5; 1; 2,5; 5 und 10Mio. Zellen pro Zellkulturschale ausgesät und für 24h mit und ohne Zugabe von 10ng FGF-2 pro ml GM weiter kultiviert. Danach wurde aus den Zellen die RNA isoliert und im Northernblot auf die p75^{NGFR}-Expression hin untersucht.

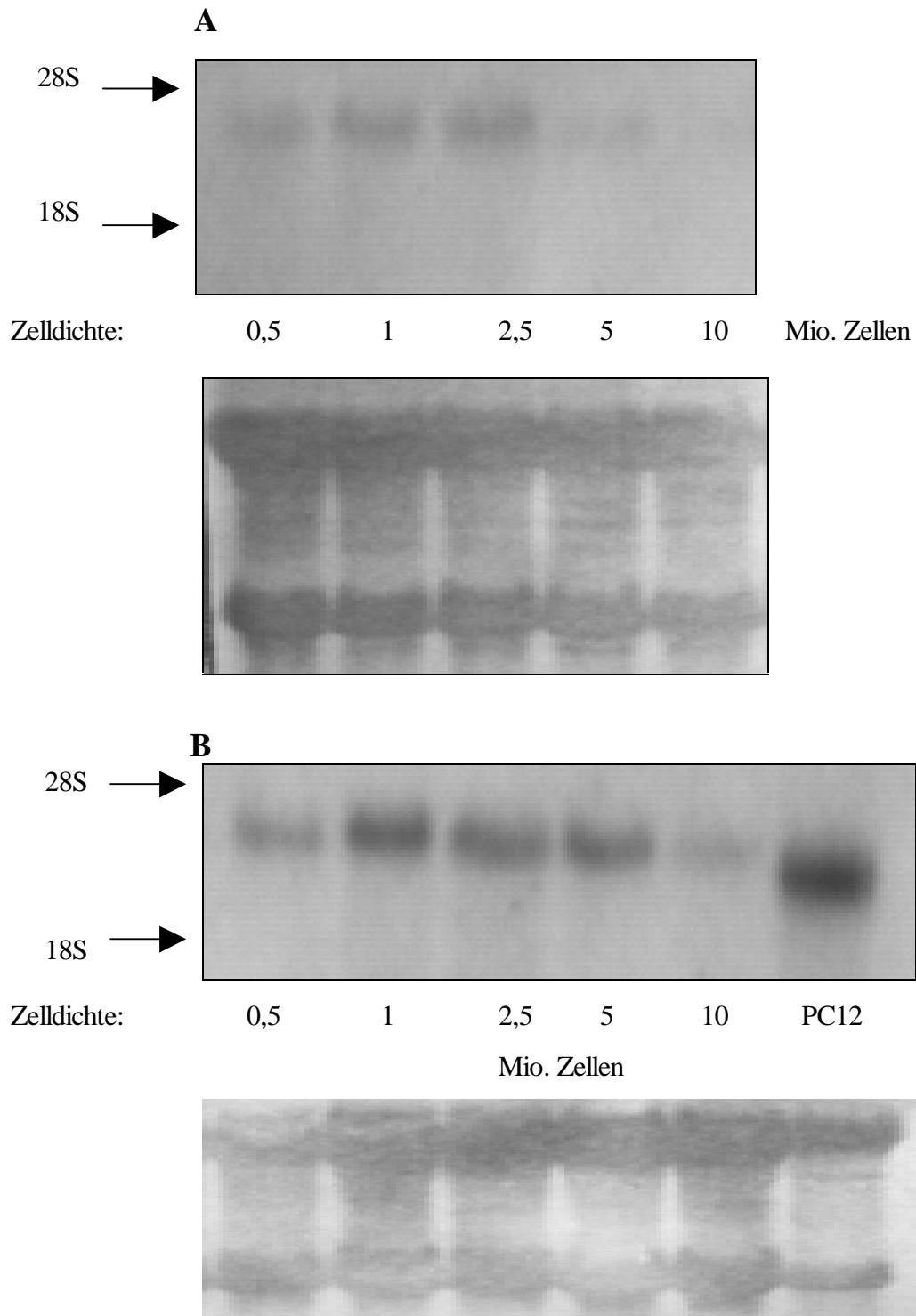


Abb. 16: Northern-Analyse der Abhängigkeit der $p75^{\text{NGFR}}$ -Expression von der kultivierten Zelldichte (A) und der Zugabe von 10ng/ml FGF-2 (B) in der C2C12-Zelllinie.

Durchführung siehe Text. Die Pfeile dienen der Größenorientierung und zeigen die 28S und 18S Ribosomal- RNA an. Mit zunehmender Zelldichte nimmt die $p75^{\text{NGFR}}$ -Expression ab (A). Die mit 10ng/ml FGF-2 kultivierten C2C12-Zellen haben eine deutlich verstärkte $p75^{\text{NGFR}}$ -Expression und reagieren unempfindlicher auf die Inhibition durch die Zunahme der Zelldichte (B). Die jeweils unteren Abbildungen zeigen eine Methylenblau-Anfärbung zur Quantifizierung der aufgetragenen RNA.

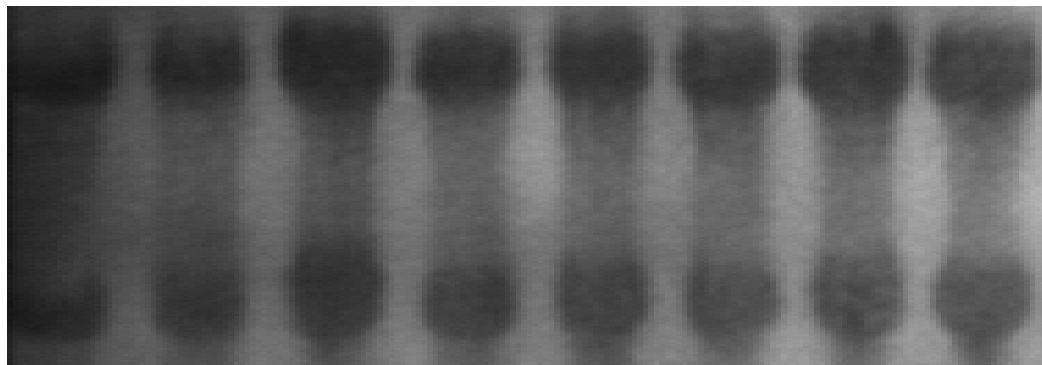
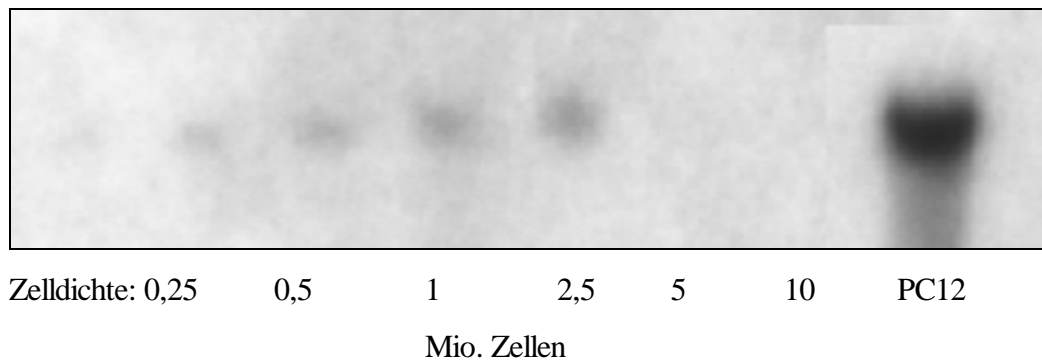


Abb. 17: Northern-Analyse der Abhängigkeit der p75^{NGFR}-Expression von der kultivierten Zelldichte in der L6-Zelllinie.

Durchführung siehe Text. Die untere Abbildung zeigt eine Methylenblau-Anfärbung zur Quantifizierung der aufgetragenen RNA. Die Expression des p75^{NGFR} in der L6-Zelllinie ist in der gleichen Weise von der Zelldichte abhängig wie die der C2C12-Zellen.

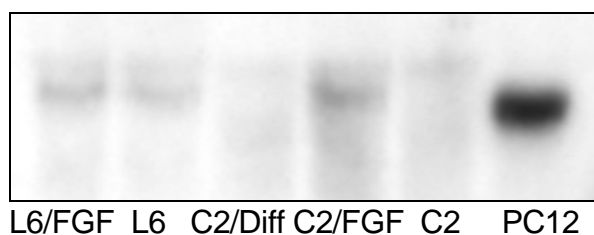


Abb. 18: Northern-Analyse über den Einfluß von FGF-2 auf die p75^{NGFR}-Expression im Vergleich zwischen L6- und C2C12-Zellen.

Die L6- und C2C12-(C2) Zellen wurden bei einer subkonfluenten Zelldichte für 24h mit 10ng/ml FGF-2 kultiviert und danach die RNA isoliert. RNA aus der PC12-Zelllinie diente als Positivkontrolle und RNA aus differenzierten C2C12-Zellen (C2/Diff) als Negativkontrolle. FGF-2 verstärkt die Expression des p75^{NGFR} in C2C12-Myoblasten, jedoch nicht in L6-Myoblasten.

Bei beiden Zelllinien steigt die p75^{NGFR}-Expression mit zunehmender Zelldichte erst an, um dann abrupt, bei einer ausgesäten Zelldichte von 5Mio. Zellen pro 10cm Ø Zellkulturschale, nach 24h (konfluente Zelldichte) kaum noch nachweisbar zu sein (Abb. 16

A und Abb. 17). Die C2C12-Zellen, die mit FGF-2 supplimentiertem Medium kultiviert wurden (Abb. 16 B), zeigen ebenfalls einen Anstieg der $p75^{\text{NGFR}}$ -Expression zwischen den ersten beiden Zellaussaatdichten, jedoch auf einem höheren Niveau als die Zellen, die kein FGF-2 im Medium hatten. Außerdem ist bei den FGF-2 behandelten C2C12-Zellen bei der Aussaatdichte von 5Mio. Zellen immer noch eine deutliche $p75^{\text{NGFR}}$ -Expression nachweisbar, die erst bei einer Aussaatdichte von 10Mio. Zellen pro Zellkulturschale abnimmt. Bei den L6-Zellen ist es wie erwartet zu keinem Anstieg der $p75^{\text{NGFR}}$ -Expression durch FGF-2 gekommen (Abb. 18).

Die Herunterregulierung der $p75^{\text{NGFR}}$ -Expression mit zunehmender Zelldichte (siehe Abb. 16 A und Abb. 17) könnte nicht nur in Abhängigkeit zum Zellzyklus stehen, wie bei den A- und I-Spermatogonien gezeigt wurde, sondern auch durch Gene reguliert werden, die an der Muskeldifferenzierung zu Myotuben beteiligt sind. Um diese Möglichkeit der $p75^{\text{NGFR}}$ -Regulation untersuchen zu können, wurde die innerhalb der Myogenese einsetzende Myogenin-Expression verfolgt, um den Grad der Differenzierung in den unterschiedlichen Zelldichten zu bestimmen.

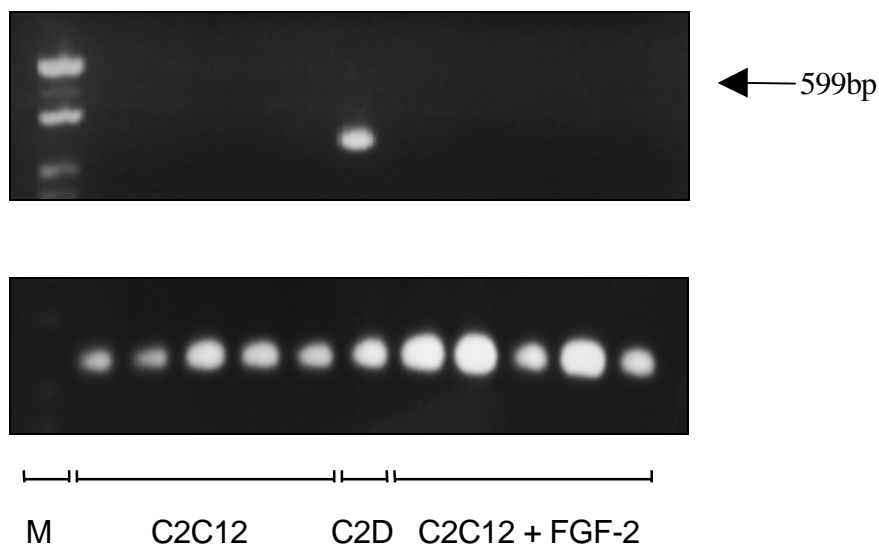


Abb. 19: RT-PCR zur Untersuchung der Myogenin-Expression der C2C12-Zellen von Abb. 21 bzw. Abb. 22.

Mit den C2C12-RNAs, welche in Abb.16 bzw. Abb. 17 eine Zelldichte abhängige bzw. eine FGF-2 modulierte $p75^{\text{NGFR}}$ -Expression zeigten, wurde zum Nachweis von Myogenin eine RT-PCR durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde RNA von differenzierten C2C12-Zellen (C2D) verwendet. Zur Überprüfung der Konzentration der eingesetzten cDNAs wurde eine PCR zum Nachweis des ribosomalen Proteins L7 (RPL7) ebenfalls durchgeführt. M= Marker (pBR 322/Hapall).

Weder im Northernblot noch durch RT-PCR (Abb. 19) lassen sich Myogenin-Transkripte in den unterschiedlich dicht ausgesäten C2C12-Zellen nachweisen. Der Zustand der Zellen läßt sich daher als prädifferentiiert beschreiben, so daß davon ausgegangen werden kann, daß an der Herunterregulierung des $p75^{NGFR}$ keine muskelspezifischen Gene innerhalb der terminalen Muskeldifferenzierung beteiligt sind. Dies schließt nicht aus, daß schon vor der Myogenin-Expression eingeleitete Prozesse darin involviert sind.

Wie die vorhergehenden Experimente ergeben haben, ist die $p75^{NGFR}$ -Expression offensichtlich von der Zelldichte abhängig. Ein weiteres Ergebnis, welches diese Vermutung unterstützt ist, daß FGF-2 die Proliferation von Myoblasten stark erhöht, die terminale Differenzierung von Myoblasten zu Myotuben verhindert und die $p75^{NGFR}$ -Expression deutlich verstärkt. Daraus ergibt sich die Frage: „Wenn die zelldichteabhängige Herunterregulierung des $p75^{NGFR}$ auf Prozessen beruht, welche der Differenzierung unmittelbar vorgeschaltet sind, wie verändert sich dann die $p75^{NGFR}$ -Expression der Zellen, wenn man den Zellen die Differenzierungskompetenz entzieht?

4.2 Regulation des $p75^{NGFR}$ Gens: Einfluß des Adenovirus E1A Proteins

Um den Einfluß der Myogenese auf die $p75^{NGFR}$ -Regulation zu untersuchen, wurde das Adenovirus E1A-Protein verwendet, welches die myogene Differenzierung supprimiert und die Transkription von muskelspezifischen Promotoren inhibiert (z.B. des MyoD1- und Myogenin Gens) (Webster et al. 1988; Enkemann et al. 1990). Die Funktionsweise des E1A-Proteins ist dabei sehr vielseitig. So bildet es Komplexe mit verschiedenen zellulären Proteinen und nimmt damit Einfluß auf eine ganze Reihe von Transkriptionsfaktoren (Harlow et al. 1986; Bayley und Mymryk 1994)). In der Muskelzelllinie L6 konnte gezeigt werden, daß E1A die Muskeldifferenzierung reprimiert, in dem es muskelspezifische bHLH-Protein inaktiviert (Braun et al. 1992).

Für die Untersuchung der E1A-Wirkung auf die Regulation des $p75^{\text{NGFR}}$ in Muskelzellen, wurde ein E1A konstitutiv exprimierender Klon der Rattenmuskelzelle L6 von T. Braun zur Verfügung gestellt, der auf ein Vorhandensein des E1A-Proteins und der reprimierten Myogenese getestet worden war (Braun et al. 1992).

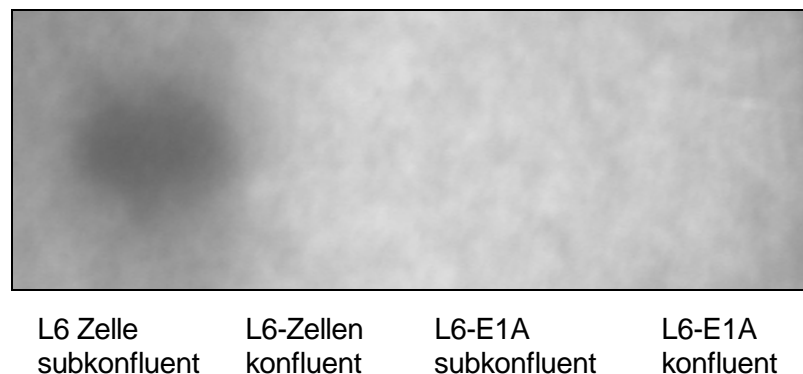


Abb. 20 : Northernblot zum Nachweis der $p75^{\text{NGFR}}$ -Expression in L6- und L6-E1A-Zellen

L6-E1A-Zellen wurden zu 1Mio. Zellen in 10cm Ø Zellkulturschalen kultiviert, nach 24h (subkonfluent) bzw. nach Erreichen der Konfluenz lysiert und die RNA isoliert. Als Kontrolle wurden normale L6-Zellen parallel kultiviert. Im Gegensatz zu den parentalen L6-Zellen exprimieren die L6-E1A-Zellen keinen $p75^{\text{NGFR}}$.

Wie aus Abb. 20 hervorgeht konnte in dem L6-E1A-Klon keine $p75^{\text{NGFR}}$ -Expression nachgewiesen werden. Trotz der proliferativen Wirkung des E1A-Proteins und der Verhinderung der Differenzierung, wird die $p75^{\text{NGFR}}$ -Expression durch die Wirkung des E1A-Proteins in den Zellen unterbunden. Das gleiche Ergebnis wurde von der neuronalen Zelllinie PC12 beschrieben, bei der ebenfalls durch das E1A-Protein die Differenzierung und die Expression des $p75^{\text{NGFR}}$ verhindert wurde (Boulukos et al. 1993). Aus diesen Befunden kann geschlossen werden, daß Differenzierungskompetenz ein entscheidendes Kriterium für die $p75^{\text{NGFR}}$ -Expression ist und, daß es grundsätzliche gemeinsame Mechanismen geben muß, die die $p75^{\text{NGFR}}$ -Expression in neuronalen und myogenen Zellsystemen reguliert die in beiden Systemen durch das E1A-Protein inhibiert werden. Die Analyse der Promotor-sequenzen des $p75^{\text{NGFR}}$ Gens bzw. die Untersuchung ihrer Funktionsweisen erscheint nun erforderlich um diese gemeinsamen Mechanismen, welche für die $p75^{\text{NGFR}}$ Regulation notwendig sind, besser verstehen zu können.

Zusammenfassung: Die Studien zur Beeinflussung der Regulation des p75^{NGF}-Rezeptors verweisen auf verschiedene Möglichkeiten, die p75^{NGFR} Expression zu aktivieren oder zu reprimieren.

Eine zunehmende Zelldichte und der damit verbundene Zell-Zellkontakt bzw. die Kontaktinhibition der Zellteilung ist ein starker Repressor der p75^{NGFR}-Expression in den Muskelzelllinien C2C12 und L6.

Dieses Ergebnis findet seine Unterstützung in dem reziproken Experiment, in dem der auf Myoblasten stark mitogen wirkende Faktor FGF-2 eine deutliche Verstärkung der p75^{NGFR}-Expression bewirkt. Die zelldichteabhängige Herunter-regulierung des p75^{NGFR} korreliert nicht mit der terminalen Differenzierung, da diese vor der Aktivierung des Myogenin-Gens stattfindet. Wie die Wirkung des E1A-Proteins auf die p75^{NGFR}-Expression zeigt, reicht eine starke Proliferation der Zellen nicht aus, die p75^{NGFR}-Expression zu aktivieren, wenn die Zelle dabei gleichzeitig ihre Fähigkeit zu differenzieren verliert.

Das NGF/p75^{NGF}-Rezeptorsystem dient daher vermutlich, wie die differenzierungsmodulierende Wirkung der p75^{NGFR}-Überexpression zeigt, als differenzierungsvorbereitendes System. Die weiterführende Fragestellung, die sich daraus ergibt, ist: Können muskelspezifische Gene dieses muskelunspezifische Gen regulieren?

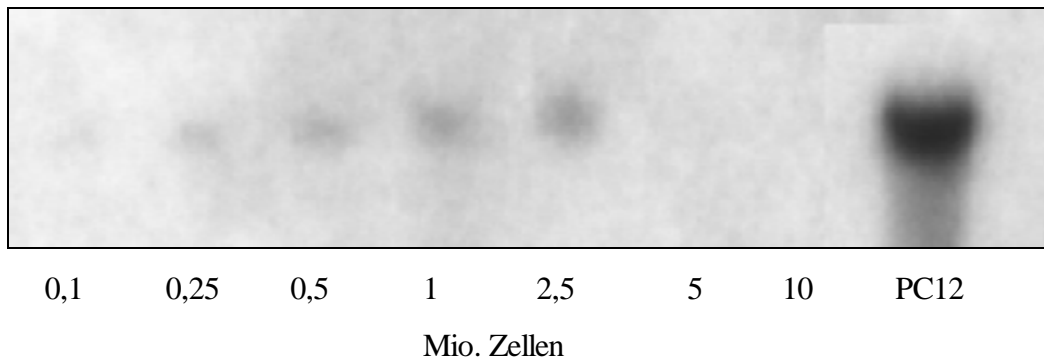
4.3 Untersuchungen des $p75^{\text{NGFR}}$ -Promotors

Um die an der $p75^{\text{NGFR}}$ -Regulation beteiligten Transkriptionsfaktoren näher zu spezifizieren, bzw. die regulatorischen Elemente im $p75^{\text{NGFR}}$ -Promotor zu charakterisieren, wurden verschiedene Promotorfragmente darauf getestet, ob sie durch myogene bHLH-Transkriptionsfaktoren beeinflusst werden können. Bisherige Untersuchungen hatten ergeben, daß die regulatorischen Elemente der $p75^{\text{NGFR}}$ -Expression sich stromaufwärts vom Startcodon befinden, also im 5'-Bereich des Gens. Wie bereits in der Einleitung beschrieben wurde, gibt es sehr wahrscheinlich eine Vielzahl von unterschiedlichen Regulationselementen in dem $p75^{\text{NGFR}}$ -Promotor, die innerhalb des Expressionmusters in den einzelnen Geweben durch die jeweiligen gewebespezifischen Transkriptionsfaktoren oder Inhibitoren erkannt werden.

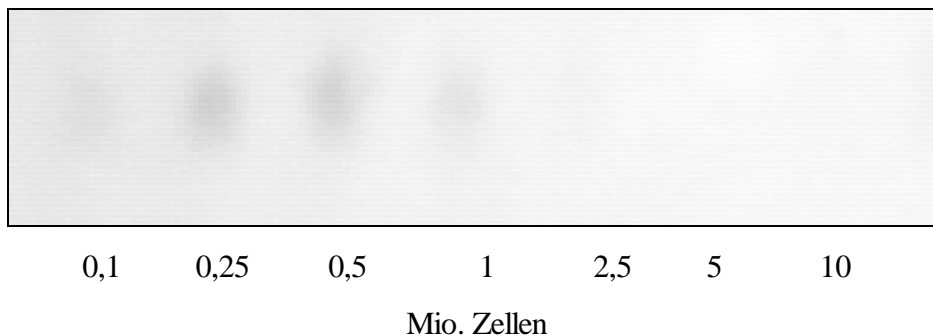
Wie von Chiaramello et al. (1995) beschrieben wurde, existieren Bereiche im $p75^{\text{NGFR}}$ -Promotor, die durch bHLH-Transkriptionsfaktoren (ME1) erkannt werden und zur Repression des $p75^{\text{NGFR}}$ -Gens führen. Ein weiteres HLH-Protein (Id) kann diese Repression rückgängig machen. Ein ähnlicher Vorgang ist für die muskelspezifischen Promotoren während der Differenzierung von Muskelzellen gezeigt worden. Hierbei inhibiert das HLH-Protein Id die Bindung des bHLH-Proteins MyoD an seine Zielpromotoren (Benezra et al. 1990).

Diesem Beispiel folgend sollte untersucht werden, ob die myogenen bHLH-Proteine die Repression des $p75^{\text{NGFR}}$ -Gens in Muskelzellen bewirken können und ob Id diese Repression verhindern kann.

Als Vorbereitung für die Promotoranalyse wurde der zeitliche Verlauf der Id-Expression in den Muskelzellen bestimmt und mit der des $p75^{\text{NGFR}}$ verglichen. Dafür wurden der vorhandene Northernblot aus dem Zelldichteexperiment mit einer radioaktiv markierten Id-Gensonde hybridisiert.

p75^{NGFR}-Expression in L6-Zellen

Id-Expression in L6-Zellen

**Abb. 21: Zelldichteabhängige p75^{NGFR} und Id-Expression in L6-Myoblasten.**

Der für die Untersuchung der zelldichteabhängigen p75^{NGFR}-Expression verwendete Northernblot wurde nach dem Entfernen der radioaktiven p75^{NGFR}-Gensonde mit einer Id-Gensonde erneut hybridisiert. Die Id-Expression ist ebenfalls von der Zelldichte abhängig, endet jedoch schon vor der des p75^{NGFR} bei einer Zelldichte von 2,5 Mio. Zellen / 10cm Ø Zellkulturschale.

Wie die Autoradiographie in Abb. 21 zeigt, kommt es bei den Muskelzellen ebenfalls, wie bei der p75^{NGFR}-Expression, zu einer Herunterregulierung der Id-Expression. Jedoch ist bei einer ausgesäten Zellzahl von 2,5 Mio. Zellen pro Zellkulturschale im Gegensatz zum p75^{NGFR} nur noch eine sehr schwache Expression nachweisbar. Da die Konzentrationsverhältnisse für die Wirkung von Id auf die bHLH-Proteine eine entscheidende Rolle spielen, wäre die vermutete positive Regulation der p75^{NGFR}-Expression durch Id nur bei einer ausgesäten Zelldichte bis 1Mio. möglich. Bei der nächsthöheren Zelldichte von 2,5 Mio. muß hier ein anderer Regulationsmechanismus vermutet werden, da bei dieser Zelldichte, bei einer starken p75^{NGFR}-Expression, nur eine sehr schwache Id-Expression zu beobachten ist. Eine Übertragung der von Chiamello et al. (1995) gemachten Beobachtung der Wirkweise von Id in neuronalen Zellen auf die Muskeldifferenzierung erscheint daher fraglich.

4.4 Promotoranalyse mittels CAT-Reporter-gen-Konstrukten

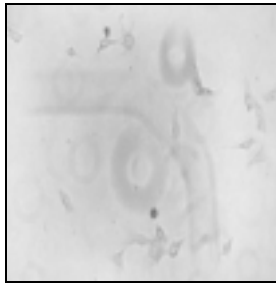
Die weiteren Untersuchungen der $p75^{\text{NGFR}}$ -Regulation in Muskelzellen wurden mit verschiedenen Promotor-Fragmenten durchgeführt. Diese wurden freundlicherweise von M. Metsis vom Laboratorium für Molekulare Neurobiologie des Karolinska Institutes in Stockholm, Schweden, zur Verfügung gestellt.

Die einzelnen Promotor-Fragmente bestanden aus unterschiedlich großen $p75^{\text{NGFR}}$ -Promotorbereichen und dem Reporter-gen Chloramphenicol-Acetyl-Transferase. Dieses bakterielle Gen wird nicht in eukaryotischen Zellen exprimiert und wurde zur Quantifizierung der Promotor-Funktion verwendet.

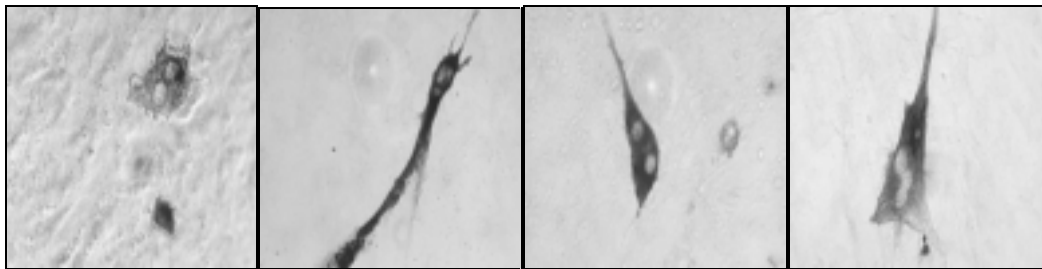
Für die Untersuchung des Einflusses der myogenen bHLH-Proteine auf die Promotor-CAT-Konstrukte wurde zunächst ein 4kb großes Promotor-Fragment verwendet, welches in transgenen Mäusen für eine ausreichende mesenchymale Expression des $p75^{\text{NGFR}}$ beschrieben worden war (Huber et al. 1995).

In dem ersten Experiment sollte überprüft werden, ob die myogenen bHLH-Transkriptionsfaktoren, ähnlich wie das bHLH-Protein ME1 in neuronalen Zellen (Chiaromello et al. 1995), die $p75^{\text{NGFR}}$ -Expression reprimieren können.

Wie im Material- und Methodenteil beschrieben wurde, wurden C3H10T1/2-Fibroblasten, die keinen $p75^{\text{NGFR}}$ exprimieren und durch myogene bHLH-Proteine zu Muskelzellen konvertiert werden können, für die transienten Transfektionen verwendet. Zur Überprüfung der vier Expressionsplasmide wurden parallel zum ersten Ansatz, C3H10T1/2 Zellen mit 5µg der einzelnen myogenen Transkriptionsfaktoren transfiziert. Mit einer immunhistochemischen Anfärbung der schweren-Kette des Myosin-Moleküls wurde die Fähigkeit der einzelnen Expressionsplasmide, Fibroblasten zu Muskelzellen zu konvertieren, kontrolliert.

A

pEMS



Myf5

MyoD

Myogenin

Myf6

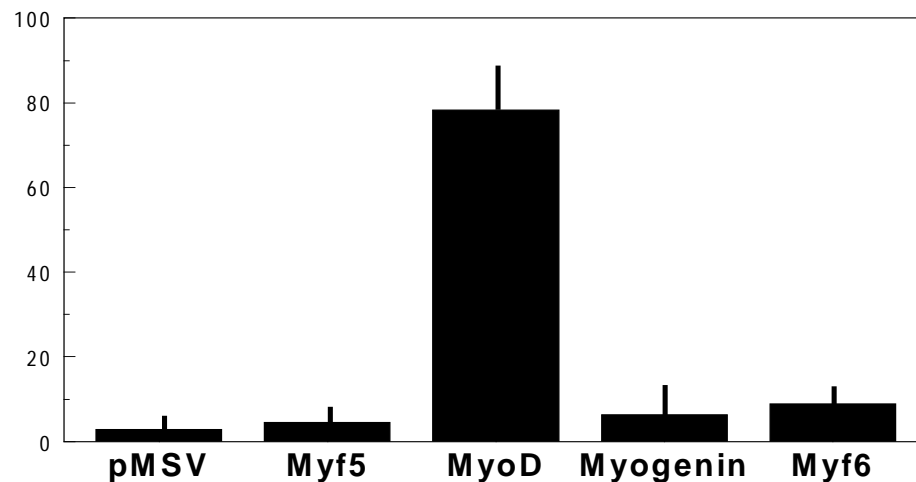
B

Abb. 22: CAT-Test, in dem der Einfluß der vier myogenen bHLH-Transkriptionsfaktoren auf den $p75^{NGFR}$ -4kb-CAT untersucht wurde.

C3H10T1/2-Fibroblasten wurden mit $5\mu\text{g}$ $p75^{NGFR}$ -4kb-CAT und $15\mu\text{g}$ des eukaryotischen Expressionsplasmids pEMS (Plasmidkontrolle), pEMS-Myf5, pEMS-MyoD, pEMS-Myogenin und pEMS-Myf6 cotransfiziert. Nach 72h wurde der CAT-Test durchgeführt. Gezeigt ist die durchschnittliche Aktivierung von mindestens drei unabhängigen Versuchen ($n=3$, $\pm\text{SEM}$). Alle vier Plasmide der myogenen bHLH Transkriptionsfaktoren konvertieren C3H10T1/2-Fibroblasten zu Muskelzellen (A). Es aktiviert aber nur MyoD den $p75^{NGFR}$ -4kb-CAT (B).

Wie aus der Abb. 22 A hervorgeht, sind alle vier eingesetzten myogenen bHLH-Expressionskonstrukte fähig, die Fibroblasten-Zellen zu Muskelzellen zu konvertieren und muskelspezifische Gene „anzuschalten“.

Im Gegensatz zu der vermuteten Inhibition des $p75^{\text{NGFR}}$ -4kb-CAT durch eines der vier bHLH-Proteine, aktiviert MyoD den Promotor um das 12-Fache im Vergleich zum transfizierten leeren pEMSV-Vektor (Abb. 22 B). Dieses Ergebnis unterstreicht die enge Verbindung des $p75^{\text{NGFR}}$ zu Differenzierungsvorgängen bzw. das Ergebnis aus dem Experiment 4.2 in dem gezeigt wurde, daß die Differenzierungskompetenz der Zellen eine Voraussetzung für die $p75^{\text{NGFR}}$ -Expression ist.

Um die MyoD-spezifische Aktivierung des $p75^{\text{NGFR}}$ -4kb-CAT besser erklären zu können, wurde die konzentrationsabhängige Aktivierung des $p75^{\text{NGFR}}$ -4kb-CAT untersucht (Abb. 23). Als weitere Überprüfung des MyoD-Effektes wurde ein konditionell aktives Hybridprotein, bestehend aus MyoD und der hormonbindenden Domäne des β -Östradiol-Rezeptors (MyoD-ER) (Hollenberg et al. 1993) eingesetzt. Parallel dazu wurde ein Myf5-ER-Konstrukt (Ragge 1996) mit dem $p75^{\text{NGFR}}$ -4kb-CAT cotransfiziert.

Das Funktionsprinzip dieser Hybridmoleküle ist, daß sie nach der Transfektion translatiert werden und sich im Cytoplasma der Zelle akkumulieren. Nach der Zugabe von β -Östradiol heftet sich das Hormon an seine Bindungsstelle. Daraufhin entfaltet sich der Hybridmolekülkomplex und entläßt das fusionierte Protein (Myf5 oder MyoD), welches dann in den Kern wandern kann, um dort seine Zielgene zu aktivieren. Da dieses System rein auf Proteinwechselwirkungen beruht, können transfektionsbedingte Ereignisse ausgeschlossen werden.

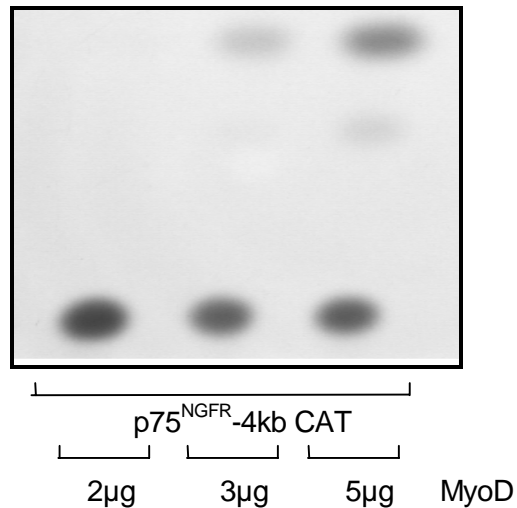


Abb. 23: Konzentrationsabhängige Aktivierung des p75^{NGFR}-4kb-CAT durch MyoD.

C3H10T1/2-Zellen wurden mit 5µg p75^{NGFR}-4kb-CAT und 2µg, 3µg und 5µg pEMSV-MyoD cotransfiziert. Nach 72h wurde der CAT-Test durchgeführt (n=2). Die Aktivierung des p75^{NGFR}-4kb-CAT durch MyoD steigt mit der Zunahme der Menge des eingesetzten Plasmids an.

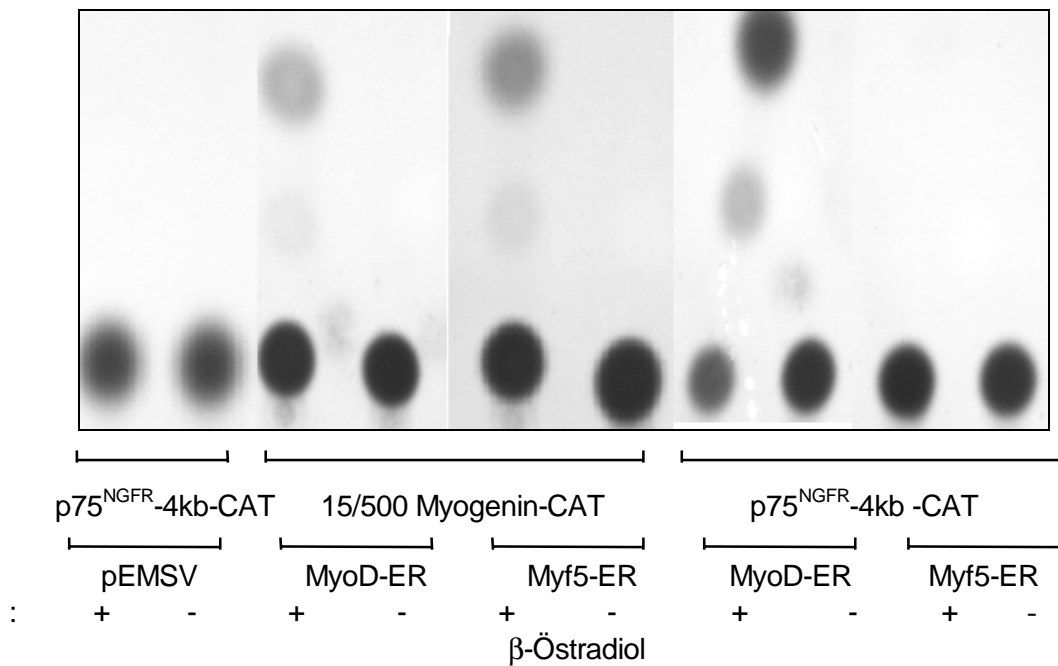


Abb. 24: CAT-Test zur Aktivierung des p75^{NGFR}-4kb-CAT mittels der β-Östradiol induzierbaren Hybridmoleküle MyoD-ER und Myf5-ER

Es wurden C3H10T1/2-Zellen mit 5µg p75^{NGFR}-4kb-CAT und 15µg des jeweiligen ER-Konstrukts cotransfiziert. Als Kontrolle wurden beide Konstrukte mit dem muskelspezifischen Reporterplasmid des Myogeninpromotors pEMBL/15-500-CAT (Braun et al. 1990) cotransfiziert. 48h nach der Transfektion wurde einem Teil der kultivierten Zellen β-Östradiol zugegeben (e.c. 3µM), die Zellen weitere 24h kultiviert und danach ein CAT-Test durchgeführt (n=3). Auch in diesem Experiment aktiviert nur MyoD-ER den p75^{NGFR}-4kb-CAT.

Aus der Abb. 24 geht hervor, daß die Zugabe von β -Östradiol, sowie die Cotransfektion mit dem Vektor pEMSV, keine Aktivierung des $p75^{\text{NGFR}}\text{-4kb-CAT}$ -Konstruktes verursacht. MyoD-ER und Myf5-ER aktivieren ohne Zugabe von β -Östradiol weder den 15/500 Myogenin-CAT noch den $p75^{\text{NGFR}}\text{-4kb-CAT}$. Nach der Zugabe von β -Östradiol wurde beim 15/500 Myogenin-CAT eine deutliche Aktivierung durch die beiden ER-Konstrukte nachgewiesen. Der $p75^{\text{NGFR}}\text{-4kb-CAT}$ wird jedoch nur durch das MyoD-ER Konstrukt aktiviert. Eine Myf5-ER-Aktivierung des $p75^{\text{NGFR}}\text{-4kb-CATs}$ konnte nicht beobachtet werden. Damit konnte mit einem weiteren Versuchsansatz bestätigt werden, daß die Aktivierung des $p75^{\text{NGFR}}\text{-4kb-CAT}$ direkt von dem Vorhandensein des MyoD-Proteins abhängt.

4.5 Die Transaktivatordomäne ist entscheidend für die $p75^{\text{NGFR}}\text{-4kb-CAT}$ Aktivierung

Als besonders interessant erscheint die unterschiedliche Fähigkeit von Myf5 und MyoD, den $p75^{\text{NGFR}}\text{-4kb-CAT}$ zu aktivieren, da bisher nur wenige Unterschiede zwischen den beiden Transkriptionsfaktoren in der Aktivierung von Genen bekannt ist, denn es konnte gezeigt werden, daß sich beide Transkriptionsfaktoren sich gegenseitig ersetzen können, also zueinander redundant sind (Weintraub 1993; Braun und Arnold 1991).

Um die möglichen, sehr vielfältigen Ursachen eingrenzen zu können, weshalb nur MyoD und nicht Myf5 den $p75^{\text{NGFR}}\text{-4kb-CAT}$ aktivieren kann, wurden von Myf5 und MyoD Hybridmoleküle eingesetzt, deren carboxyterminalen Transaktivatordomänen gegen die Transaktivatordomäne des viralen Transkriptions-faktors VP16 des Herpes simplex Viruses ausgetauscht worden waren (Braun et al. 1992; Weintraub et al. 1991). Diese Fusionsproteine haben eine sehr viel höhere aktivierende Wirkung auf Promotoren als die Wild-Typ Proteine, ohne ihre muskelspezifischen Eigenschaften zu verlieren (Braun et al. 1992).

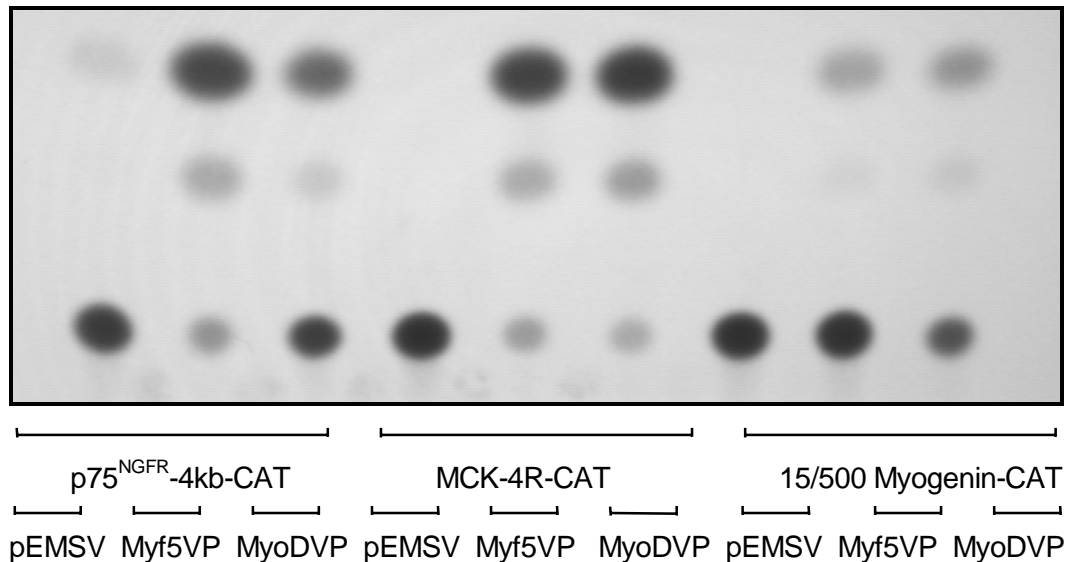


Abb. 25: Aktivierung des p75^{NGFR}-4kb-CAT durch MyoD-VP16 und Myf5-VP16.

Es wurden C3H10T1/2-Fibroblasten mit 5µg p75^{NGFR}-4kb-CAT bzw. mit 5µg der beiden anderen Reportergene und 15µg Myf5-VP16 oder MyoD-VP16 cotransfiziert und nach 72h ein CAT-Test durchgeführt (n=3). Die Aktivierung des 15/500 Myogenin-CAT bzw. MCK-4R-CAT dienen als Positivkontrolle der verwendeten Plasmide. Die Hybridmoleküle Myf5-VP16 und MyoD-VP16 aktivieren beide den p75^{NGFR}-4kb-CAT.

Wie der CAT-Test in Abb. 25 zeigt, können Myf5-VP16 und MyoD-VP16, wie erwartet, den MCK-4R-CAT und den 15/500 Myogenin-CAT aktivieren. Im Gegensatz zum Myf5 Wild-Typ-Protein kann Myf5-VP16 den p75^{NGFR}-4kb-CAT ebenso stark aktivieren wie MyoD-VP16.

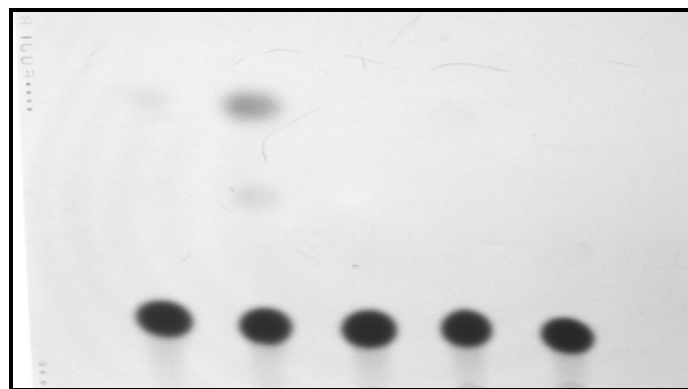
Dieses Ergebnis zeigt, daß die DNA bindende Domäne des Myf5-Proteins zur Aktivierung des p75^{NGFR}-4kb-CAT fähig ist, und die Transaktivatorodomäne von Myf5 entweder nur sehr schwach oder gar nicht den p75^{NGFR}-4kb-CAT transaktiviert.

Zusammenfassung: Im Gegensatz zu dem in der Literatur beschriebenen Beispiel der Repression des $p75^{\text{NGFR}}$ -Promotors in neuronalen Zellen durch bHLH-Proteine (ME1), wird ein $p75^{\text{NGFR}}$ -4kb-CAT-Konstrukt in transienten Transfektions-experimenten durch das bHLH-Protein MyoD aktiviert. Andere myogene bHLH-Transkriptionsfaktoren, wie Myf5, Myogenin und Myf6, beeinflussen den $p75^{\text{NGFR}}$ -4kb-CAT nicht. Ein direkter Vergleich zwischen Myf5 und MyoD ergab, daß ein in seiner Transaktivator-domäne verändertes Hybridmolekül Myf5-VP16 den $p75^{\text{NGFR}}$ -4kb-CAT ebenso stark aktivieren kann, wie MyoD-VP16. Dies gibt einen ersten Hinweis darauf, daß die Transaktivator-domäne von entscheidender Bedeutung für die $p75^{\text{NGFR}}$ -4kb-CAT Aktivierung ist. Somit ist der aktivierende Effekt des myogenen Transkriptionsfaktors MyoD in vier völlig unabhängigen Experimenten dokumentiert worden. Die MyoD vermittelte Aktivierung des $p75^{\text{NGFR}}$ -4kb-CAT bietet einen Erklärungsansatz für die auffällige Paralelität der inhibierenden Wirkung des E1A-Proteins auf die Myogenese und die $p75^{\text{NGFR}}$ -Expression.

4.6 *MyoD* aktiviert den $p75^{NGFR}$ in proliferierenden Zellen

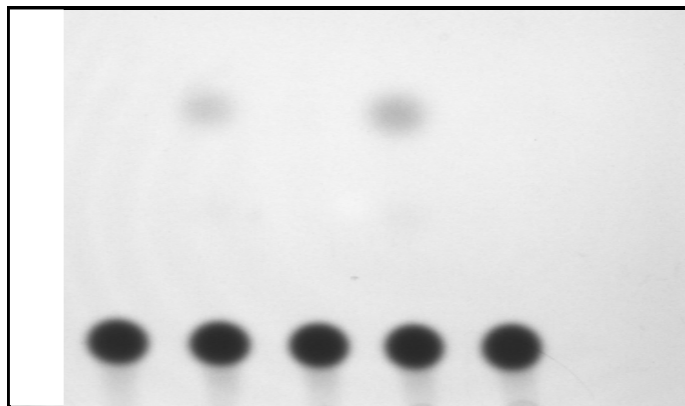
Wie Wheeler et al. (1992) in Rattenembryonen zeigen konnten, werden der $p75^{NGFR}$ und *MyoD* gleichzeitig in Myoblasten exprimiert. Damit *MyoD* das Gen des $p75^{NGFR}$ in den Zellen aktivieren kann, müßte *MyoD* den $p75^{NGFR}$ -Promoter in proliferierenden Zellen aktivieren können. Weintraub (1993) schreibt zu diesem Thema in einem Übersichtsartikel, daß solche Promotoren vorhanden sein müssen. Er begründet dies damit, daß bei Myogenin-Knockout-Mäusen Myoblasten in ausreichender Menge an der korrekten Position vorhanden sind, jedoch nicht mehr zu Myotuben fusionieren können. Bei den *Myf5/MyoD*-Doppelmutanten hingegen sind keine Myoblasten in den Muskelkompartimenten vorhanden (Rudnicki et al. 1993). Ein weiterer Anhaltspunkt ist die Autoregulation von *MyoD* selbst (Thayer et al. 1988; Benezra et al. 1990).

Es sollte deshalb in dem folgenden Experiment untersucht werden, ob *MyoD* in sich im Wachstum befindende Zellen den $p75^{NGFR}$ -4kb-CAT aktivieren kann. Zum Vergleich wurde in einem parallelen Ansatz die Aktivierung des 15/500 Myogenin-CAT-Reportergens mit verfolgt. Von dem Myogenin-Promotor ist bekannt, daß *MyoD* ihn erst nach Beendigung der Zellteilungsaktivitäten direkt aktivieren kann und damit die terminale Muskeldifferenzierung einleitet (Hollenberg et al. 1993; Thorburn et al. 1993).



10T1/2 24h nach der
Transfektion

p75^{NGFR}-4kb-CAT Myogenin-CAT pEMBL-CAT
pMSV MyoD pMSV MyoD pMSV



10T1/2 72h nach der
Transfektion

p75^{NGFR}-4kb-CAT Myogenin-CAT pEMBL-CAT
pMSV MyoD pMSV MyoD pMSV

Abb. 26: Vergleich zwischen der MyoD vermittelten Aktivierung des p75^{NGFR}-4kb-CAT und des 15/500 Myogenin-CATs in proliferierenden (nach 24h) und ruhenden Zellen (nach 72h).

Die Zellen wurden mit 5µg des jeweiligen Reportergens und 15µg pEMSV als Kontrolle, sowie mit 15µg pEMSV-MyoD cotransfiziert. Mit den Zellen wurde 24h nach der Transfektion, während sie in GM kultiviert wurden und nach weiteren 48h in DM ein CAT-Test durchgeführt (n=3). Im Gegensatz zum 15/500 Myogenin-CAT wird der p75^{NGFR}-4kb-CAT bereits 24h nach der Transfektion durch MyoD Aktiviert.

Das Ergebnis des CAT-Testes in der Abb. 26 zeigt, daß der p75^{NGFR}-4kb-CAT bereits innerhalb der ersten 24h durch MyoD aktiviert wird, obwohl die Zellen subkonfluent in GM kultiviert wurden. Eine Aktivierung des 15/500 Myogenin-CATs fand erst statt, nachdem die Zellen in der Zellkulturschale konfluent gewachsen waren und in DM kultiviert wurden.

Eine konstitutive Aktivität, durch den Vektor pEMBL-CAT, kann dabei ausgeschlossen werden. Daß MyoD den Myogenin-Promotor innerhalb der ersten 24h in Gegenwart von dem Wachstumsmedium (GM) nicht aktivieren kann, hatte Ragge (1996) bereits an der C2C12-Zelllinie gezeigt, was den obigen Ergebnissen entspricht. Somit scheint der $p75^{NGFR}$ -Promotor ein durch MyoD aktiviertes Myoblasten-Zielgen (Target) zu sein, zumindest aber eine Erkennungssequenz zu enthalten, die von MyoD in proliferierenden Zellen aktiviert werden kann.

Zusammenfassung: Der $p75^{NGFR}$ und MyoD werden in Myoblasten coexprimiert, was eine MyoD beeinflusste $p75^{NGFR}$ -Expression *in vivo* möglich erscheinen läßt. Eine Voraussetzung hierfür ist die Fähigkeit des MyoD-Proteins, in proliferierenden Zellen Promotoren zu aktivieren. Im Gegensatz zum Myogenin-Promotor als Marker für eine terminale Differenzierung der Zellen, wird ein $p75^{NGFR}$ -4kb-CAT-Reportergen durch MyoD in sich teilenden Zellen aktiviert.

4.7 Funktionsanalyse unterschiedlicher $p75^{NGFR}$ -Promotor-CAT-- Fragmente auf den MyoD-Effekt

Für die Aufklärung der MyoD vermittelten Aktivierung des $p75^{NGFR}$ -4kb-CAT ist es besonders interessant, die dafür erforderlichen Promotorregionen zu bestimmen. Denn die Kenntnis über diese Promotorsequenzen könnte die aufgestellte Hypothese, daß der $p75^{NGFR}$ zu den durch myogene bHLH-Transkriptionsfaktoren in proliferierenden Myocyten regulierten Genen gehört, weiter unterstützen. Darüber hinaus könnte man einen Einblick in die Interaktion der Mitglieder der MyoD-Familie mit anderen Transkriptionsfaktoren oder sonstigen Proteinen bekommen.

Die Untersuchung des $p75^{NGFR}$ -Promotors erbrachte in den letzten Jahren eine Reihe von unterschiedlichen regulativen Bereichen. Mit einer 6,7kb großen 5'-flankierenden Region des humanen $p75^{NGFR}$ -Gens konnten Taiji et al. (1992) eine FGF-2 vermittelte Aktivierung zeigen. Des weiteren konnten Metsis et al. (1992) mit unterschiedlich langen Promotorfragmenten aktivierende und reprimierende Regionen feststellen.

So konnten sie zeigen, daß ein 0,4kb großes Promotorfragment für eine ausreichende CAT-Aktivität genügt. Außerdem wurden All-trans-Retinsäure (eng. retinoic acid)

aktivierte Bereiche und Testosteron reprimierende Regionen (-610 bis -860; -1840 bis -4800) beobachtet.

Die Analyse des von Metsis et al. (1992) sequenzierten, ca. 2kb großen $p75^{NGFR}$ -Promotorfragments ergab, daß mehrere potentielle MyoD-Bindungsstellen vorhanden sind. Eine dieser E-Boxen, welche innerhalb der ersten 0,4kb vor dem Startcodon liegt, wird durch den bHLH-Transkriptionsfaktor ME1 gebunden und führt zur Repression der $p75^{NGFR}$ -Expression (Chiaramello et al. 1995).

In einem ersten Experiment zur Untersuchung der MyoD-Aktivierung des $p75^{NGFR}$ -CAT-Reportergens wurde mit diesem 0,4kb großen Promotorfragment die Fähigkeit von MyoD zur Aktivierung untersucht.

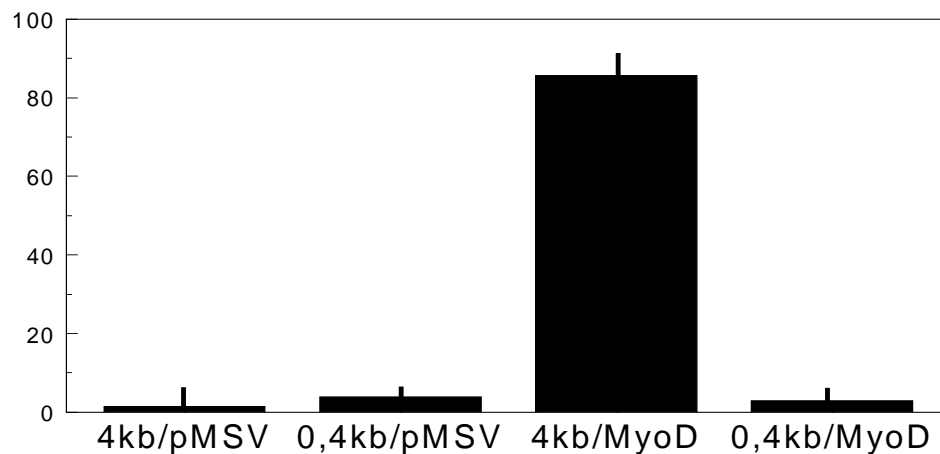


Abb. 27: Vergleich zwischen einem 0,4kb und 4kb $p75^{NGFR}$ -Promotorfragment auf MyoD-Aktivierbarkeit.

C3H10T1/2-Zellen wurden mit 5 μ g des $p75^{NGFR}$ 0,4kb-CAT bzw. 5 μ g $p75^{NGFR}$ -4kb-CAT und 15 μ g pEMSV-MyoD cotransfiziert. Mit den Zellen wurde nach 72h ein CAT-Test durchgeführt. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte (n=3), \pm SEM. MyoD kann nicht das von ME1 erkannte $p75^{NGFR}$ 0,4kb-CAT-Konstrukt aktivieren.

Eine Aktivierung des 0,4kb Promotorfragmentes ist durch MyoD nicht möglich (Abb. 27). Somit muß die für die MyoD-Aktivierung erforderliche Region oberhalb der 0,4kb zu finden sein, was für die weitere Untersuchung anderer Promotor-fragmente von Bedeutung ist.

Eine erste Aussage ist bereits nach diesem Experiment möglich, denn wie der CAT-Test zeigt, erkennen die bHLH-Proteine ME1 und MyoD vermutlich unterschiedliche

E-Boxen., was darauf hindeutet, daß der MyoD-Effekt auf den $p75^{\text{NGFR}}$ -4kb-CAT spezifisch ist, und nicht auf der Erkennung einer ubiquitären bHLH-Bindungsstelle beruht. Außerdem zeigt dieses Experiment, daß die MyoD vermittelte Aktivierung des $p75^{\text{NGFR}}$ -4kb-CAT durch die spezifische $p75^{\text{NGFR}}$ -Promotorsequenzen vermittelt wird und nicht durch zufällige Bindungsstellen im verwendeten Vektor.

Zur weiteren Promotoranalyse wurden die von Metsis et al. (1992) beschriebenen Promotorfragmente auf ihre MyoD-Aktivierbarkeit hin untersucht.

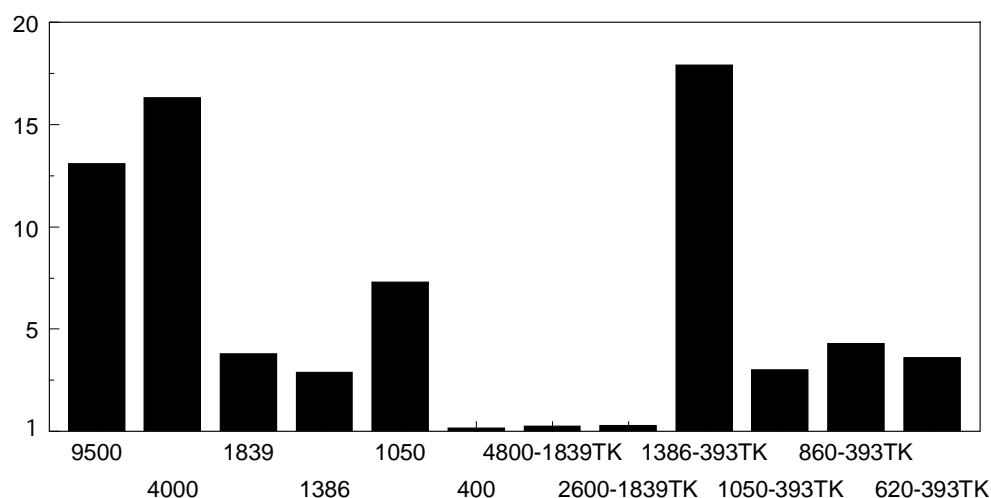


Abb. 28: Untersuchung unterschiedlich großer $p75^{\text{NGFR}}$ -CAT-Reportergene auf ihre MyoD-Aktivierbarkeit.

5µg der pBLCAT2-Konstrukte, in denen unterschiedlich große $p75^{\text{NGFR}}$ -Promotorfragmente inseriert waren, wurden mit 15µg pEMSV-MyoD in C3H10T1/2-Zellen cotransfiziert und nach 72h der CAT-Test durchgeführt (n=1-3). Erklärung siehe Text.

Die Aktivierung der unterschiedlichen Promotor-Konstrukte grenzt den für die MyoD-Aktivierung in Frage kommenden Bereich auf die ersten 2000 Basenpaare des 5'-flankierenden Genbereichs ein (Abb. 28). Im einzelnen zeigt die Graphik, daß innerhalb des Bereichs von -1839 bis -4800 keine MyoD aktivierbaren Sequenzen vorhanden sind, was durch die Untersuchung des -1839 bis -2600 Fragments unterstützt wurde. Wie die Aktivierung der 9,5kb und 4,8kb großen Fragmente im Vergleich zu dem 1839bp und kleineren Fragmenten vermuten lassen, könnten in dem Bereich von -1839bp stromaufwärts Verstärkersequenzen vorhanden sein, die sich einer direkten MyoD-Aktivierung entziehen. Wie bereits gezeigt wurde, befinden sich keine MyoD

responsiven Elemente in dem Bereich von -1 bis -393, so daß auch Konstrukte verwendet wurden, in denen dieser Bereich und längere gegen den Minimalpromotor der Thymidinkinase (TK) des Herpes-simplex-Viruses ausgetauscht wurden. Dieses Verfahren erlaubte, ein Fragment zu isolieren (-620 bis -393), welches nur noch eine einzelne E-Box enthält und noch durch MyoD aktiviert werden konnte.

Zusammenfassung: Die Untersuchung verschiedener p75^{NGFR}-Promotorfragmente ergab, daß eine E-Box, welche durch das bHLH-Protein ME1a gebunden wird, nicht für die MyoD-Aktivierung verantwortlich ist. Es konnte vielmehr ein Bereich zwischen -393bp bis -620bp gefunden werden der eine einzelne E-Box enthält und durch MyoD aktivierbar war.

4.8 Welche Domänen des MyoD-Proteins sind für die p75^{NGFR}-CAT Aktivierung notwendig?

Die Myogenese regulierenden Faktoren (MRF) enthalten eine konservierte, basische, DNA-bindende Domäne, die an das DNA-Motiv CANNTG der E-Box bindet. Dieses DNA-Motiv ist in vielen muskelspezifischen Genen enthalten. Es konnte gezeigt werden, daß eine Deletion dieser E-Boxen in einigen Promotoren die muskelspezifische Transkription beendet (Sartorelli et al. 1990). Eine weitere, für die Transkription von muskelspezifischen Genen wichtige Proteindomäne ist die Helix-Schleife-Helix- (eng. Helix-Loop-Helix; HLH) Domäne, die für eine Dimerisierung mit anderen HLH-Proteinen verantwortlich ist (Rudnicki et al. 1994; Davis et al. 1990; Braun et al. 1990; Winter et al. 1992). Die Dimerisierung zwischen dem E2A-Genprodukt E12 und den Mitgliedern der MyoD-Familie ist für die *in-vivo* Funktion notwendig und stellt einen regulatorischen Knotenpunkt in der Aktivierung verschiedener Muskelregulatoren dar (Lassar et al. 1991, Murre et al. 1989).

Es wurde zunächst überprüft, ob das mit MyoD heterodimerisierende HLH-Protein E12 in Abwesenheit von MyoD den $p75^{\text{NGFR}}$ -4kb-CAT aktivieren kann.

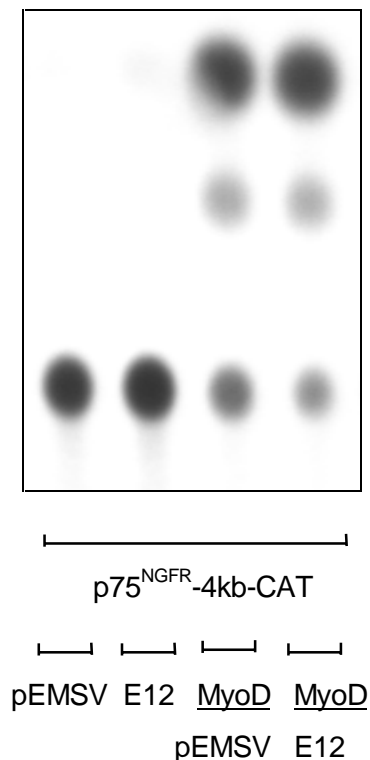


Abb. 29: CAT-Test zur Untersuchung des Einflusses von E12 auf den $p75^{\text{NGFR}}$ -4kb-CAT.

In diesem Experiment wurden 5µg $p75^{\text{NGFR}}$ -4kb-CAT und 15µg eines die E12-cDNA enthaltenden Expressionsplasmids in C3H10T1/2-Zellen cotransfiziert. Nach 72h wurde ein CAT-Test durchgeführt (n=3). E12 kann den $p75^{\text{NGFR}}$ -4kb-CAT nicht allein aktivieren.

Wie aus der Abb. 29 ersichtlich ist, kann das HLH-Protein E12 den $p75^{\text{NGFR}}$ -4kb-CAT nicht allein aktivieren. Eine Verstärkung des MyoD-Effektes auf den $p75^{\text{NGFR}}$ -4kb-CAT durch eine Cotransfektion von E12 und MyoD konnte nicht beobachtet werden. Die mögliche Notwendigkeit des Vorhandenseins des E12-Proteins oder anderer HLH-Proteine an der Aktivierung des $p75^{\text{NGFR}}$ -4kb-CAT, ist bei dieser Versuchsanordnung nicht nachweisbar, da E12 ubiquitär exprimiert wird (also auch in C3H10T1/2 Zellen vorhanden ist).

4.8.1 Mutationen in der cDNA des MyoD-Gens

Zur weiteren Aufklärung der Bereiche des MyoD-Proteins, die an der Aktivierung des p75^{NGFR}-4kb-CAT beteiligt sind, wurden verschiedene MyoD-Konstrukte, die unterschiedliche Mutationen in ihrer cDNA enthielten, getestet (siehe Tab. 4). In dem Experiment wurde die Aktivierung p75^{NGFR}-4kb-CAT mit der des artefiziellen MCK-4R-CAT, der eine tetramerisch, hintereinander angeordnete Minimal-E-Box des Muskelkreatin-kinase- (MCK) enhancers enthält, verglichen (Braun et al. 1992; Weintraub et al. 1991). Dabei diente der MCK-4R-CAT als Kontrolle für die in der Literatur beschriebenen Eigenschaften der verwendeten MyoD-Mutanten in Tab. 4.

Die verschiedenen MyoD-Mutanten wurden freundlicherweise von Herrn R. Schreck vom Institut für Med. Strahlenkunde in Würzburg zur Verfügung gestellt.

MyoD Mutanten**Funktionelle Beschreibung aus der Literatur**

MyoD	Wildtyp cDNA in pEMSV-Expressionsplasmid
MyoD Δ 3-56 (Δ N)	Deletion der N-terminalen Transaktivator-domäne: Aktiviert Myogenese in transienten und stabilen transfectionen. DNA-Bindung. Aktiviert kaum den MCK-4R-CAT
MyoD Δ 63-99	Deletion der an Cystein- und Histidin reichen Region: Aktiviert Myogenese in transienten und stabilen transfectionen. DNA-Bindung
MyoD Δ 102-135	Deletion der basischen Region: Aktiviert <u>nicht</u> die Myogenese in transienten und stabilen transfectionen. <u>Keine</u> DNA-Bindung.
MyoD Δ 143-162	Deletion der Myc ähnlichen HLH Region: Aktiviert <u>nicht</u> die Myogenese in transienten und stabilen transfectionen. <u>Keine</u> DNA-Bindung.
MyoD Δ T115 \rightarrow N	Substitution der Aminosäure T115 durch N: Erniedrigte DNA-Bindung. Aktiviert den MCK-4R-CAT
MyoD Δ A114 \rightarrow N	Substitution der Aminosäure A114 durch N: DNA-Bindung nur mit E12. Aktiviert <u>nicht</u> den MCK-4R-CAT
MyoD Δ A114 \rightarrow T	Substitution der Aminosäure A114 durch T: DNA-Bindung nur mit E12. Aktiviert <u>nicht</u> den MCK-4R-CAT. Dominant negativer Inhibitor der Myogenese.
MyoD Δ A114 \rightarrow D	Substitution der Aminosäure A114 durch D: DNA-Bindung nur mit E12. Aktiviert <u>nicht</u> den MCK-4R-CAT

Tab.4: Verschiedene Deletions- und Substitutionsmutanten geben einen Aufschluß über die Funktionsweise des MyoD-Proteins als Transkriptionsfaktor; zusammengestellt nach: Tapscott et al. 1988; Davis et al. 1990; Weintraub et al. 1991; Weintraub et al. 1990; Davis et al. 1992; Bengal et al. 1994.

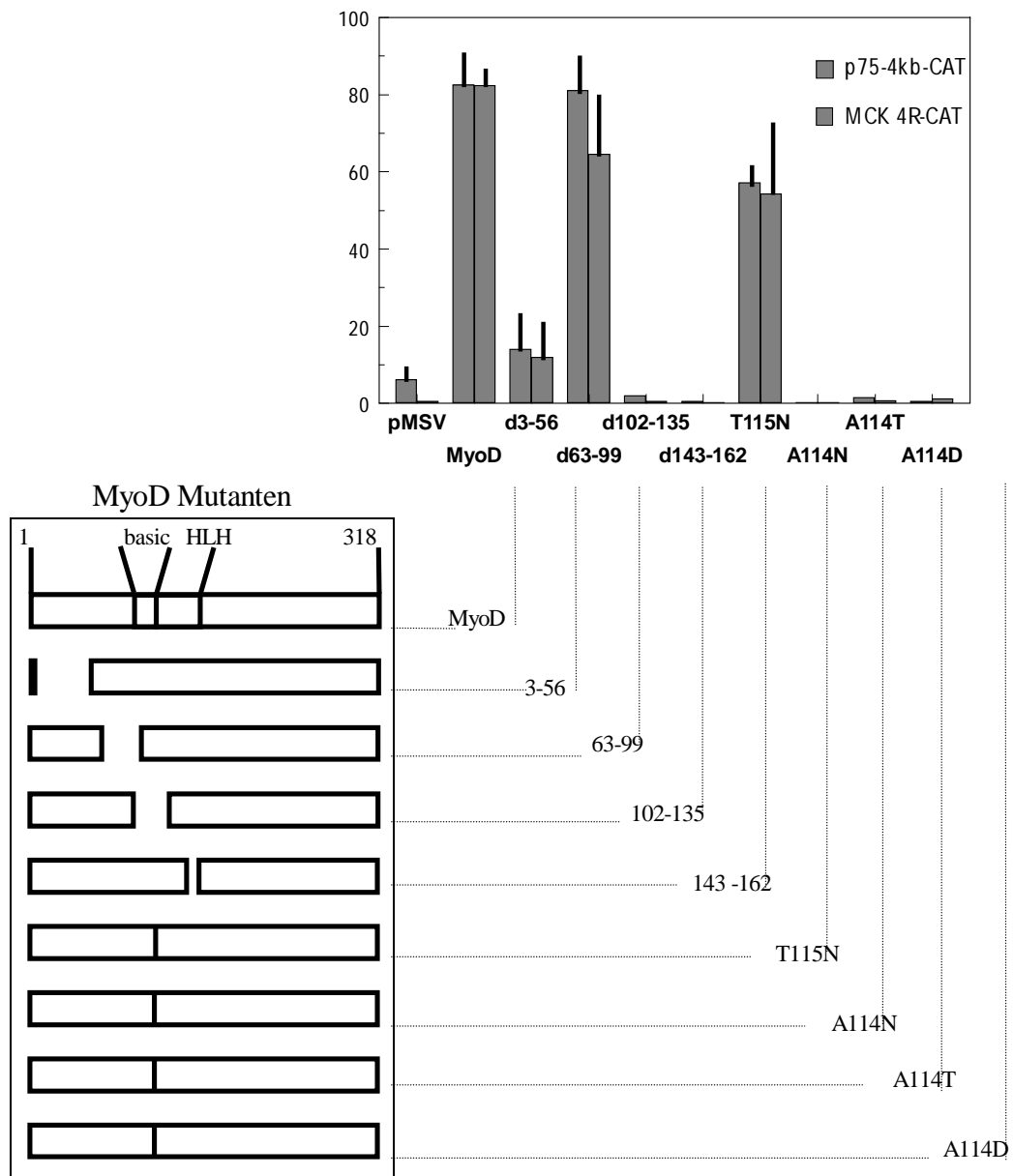


Abb. 30: Vergleich zwischen der Aktivierbarkeit des p75^{NGFR}-4kb-CAT und des MCK-4R-CAT durch verschiedene MyoD-Mutanten.

C3H10T1/2-Fibroblasten wurden mit 5µg MCK4R-CAT bzw. p75^{NGFR}-4kb-CAT und 15µg der jeweiligen pEMSV-MyoD-Mutante cotransfiziert und nach 72h der CAT-Test durchgeführt (n=3). Die Säulen repräsentieren Mittelwerte (n=3), ±SEM. Die N-terminale Transaktivator-domäne ist entscheidend für die p75^{NGFR}-4kb-CAT Aktivierung durch MyoD.

Für die muskelspezifische Aktivierung von Genen durch MyoD sind die basische- und die HLH-Domäne von essentieller Bedeutung. Die basische Region ist für die Erkennung der MyoD-Bindungsstelle auf der DNA sowie für die muskelspezifische transkriptionelle Aktivierung und Konversion von Fibroblasten zu Muskelzellen erforderlich.

In dieser basischen Region sind die Aminosäuren 114 (Alanin) und 115 (Threonin) (ATM-Motiv) entscheidend (Weintraub et al. 1991; Davis et al. 1992). Die HLH-Region hingegen wird für die Oligomerisierung des MyoD-Proteins zu Homodimeren oder Heterodimeren benötigt (Davis et al. 1990). Alle weiteren Proteindomänen scheinen keinen Einfluß zu haben oder können, wie die Transaktivator-domäne, durch kooperierende Proteine ersetzt werden (Molkentin et al. 1995).

Die verwendeten MyoD-Mutanten sollten zeigen, ob die für die Aktivierung der Myogenese verantwortlichen Domänen des MyoD-Proteins ebenfalls für die Aktivierung des $p75^{\text{NGFR}}$ -4kb-CAT erforderlich sind. Außerdem gelten die in der Literatur angegebenen Substitutionsmutanten A114 \rightarrow T und A114 \rightarrow D als positive Kontrollmutanten. Diese Kontrollmutanten besitzen die Fähigkeit, an die E-Box zu binden, ohne zu transaktivieren, was beweist, daß es sich bei der MyoD vermittelten Aktivierung von Promotoren um einen direkten MyoD-Effekt handelt (Davis et al. 1990; Eckner 1996).

Wie die Graphik in Abb. 30 zeigt, gibt es keinen Unterschied zwischen der Aktivierung des $p75^{\text{NGFR}}$ -4kb-CAT und des MCK-4R-CAT. Alle verwendeten MyoD-Mutanten zeigen die in der Literatur beschriebenen Eigenschaften. Die nicht vorhandene Fähigkeit der positiven Kontrollmutanten des MyoD-Proteins zeigen, daß die Aktivierung des $p75^{\text{NGFR}}$ -4kb-CAT durch MyoD ein direkter Effekt ist. Eine Ausnahme können solche Proteine sein, für die Alanin 114 für die Assoziation erforderlich ist. Des weiteren läßt sich aus dem Experiment ableiten, daß die für die Bindung einer E-Box erforderlichen Bereiche des MyoD-Moleküls essentiell sind für die Aktivierung des $p75^{\text{NGFR}}$ -4kb-CAT. Eine weitere interessante Beobachtung ist, daß $\Delta\text{N-MyoD}$ den $p75^{\text{NGFR}}$ -4kb-CAT nur minimal aktivieren kann. Denn wie von Weintraub et al. (1990) beschrieben wurde, kann $\Delta\text{N-MyoD}$ den MCK4R-CAT nur sehr schwach aktivieren, zeigte jedoch in einem Nachfolgeexperiment eine fast dem MyoD-Wild Typ-Protein entsprechende Aktivierung bei einem 3,3kb langen MCK-Promotor-CAT-Konstrukt. Es wurde von den Autoren postuliert, daß ein an $\Delta\text{N-MyoD}$ assoziiertes Protein, z.B. MEF2, die $\Delta\text{N-MyoD}$ -DNA-Bindung stabilisieren könnte (vgl. Buchberger et al. 1994; Molkentin et al. 1995).

Daraus ergibt sich für die schwache Aktivierung des $p75^{\text{NGFR}}$ -4kb-CAT durch ΔN -MyoD, daß hier keine Stabilisierung durch ein weiteres Protein erfolgt, oder aber ein solches Protein für seine Assoziation an MyoD die N-terminale Domäne benötigt. Eine weitere Möglichkeit wäre, daß ein solches stabilisierendes Protein zwar an MyoD bindet, jedoch nicht transaktivieren kann, da dafür benötigte E-Box flankierende Regionen in dem $p75^{\text{NGFR}}$ -Promotor fehlen.

Wie die Nichtaktivierung des $p75^{\text{NGFR}}$ -4kb-CAT durch die in ihrer HLH-Domänen deletierten MyoD-Mutante ($\Delta 146-162$) zeigt (Abb. 31), ist die Möglichkeit zu homo- bzw. heterodimerisieren für die Aktivierung des $p75^{\text{NGFR}}$ -4kb-CAT durch MyoD essentiell.

Zusammenfassung: Das mit MyoD kooperierende HLH Protein E12 war nicht allein in der Lage den $p75^{\text{NGFR}}$ -4kb-CAT zu aktivieren. Es ist daher auszuschließen, daß die beobachtete Aktivierung des $p75^{\text{NGFR}}$ -4kb-CAT durch das an MyoD assoziierte Protein vermittelt wird, was durch die Konzentrationsabhängigkeit des MyoD-Effekts unterstützt wurde.

Unterschiedliche Mutationen des MyoD Proteins zeigten, daß für die Aktivierung des $p75^{\text{NGFR}}$ -4kb-CAT die gleichen Domänen benötigt werden, wie sie schon zuvor für die Aktivierung anderer, muskelspezifischer Promotoren durch MyoD beschrieben wurden. Eine Ausnahme ist hierbei eine in der N-terminalen Transaktivator-domäne defiziente MyoD Mutante, bei der gezeigt wurde, daß sie ein 3,3 kb großes MCK-Promotorfragment aktivieren kann (Weintraub et al. 1990), jedoch nicht den $p75^{\text{NGFR}}$ -4kb-CAT zu aktivieren vermochte. Dieses unterschiedliche Verhalten der ΔN -MyoD-Mutante läßt einen anderen Aktivierungs-mechanismus für den $p75^{\text{NGFR}}$ -4kb-CAT als für den MCK-Promotor vermuten.

4.9 Mit MyoD interagierende Proteine regulieren die p75^{NGFR}-4kb-CAT Aktivität

Nach den bisherigen Ergebnissen dieser Arbeit ist die Aktivierung des p75^{NGFR}-4kb-CAT durch den myogenen Transkriptionsfaktor MyoD nicht allein von diesem abhängig, sondern wird auch durch an MyoD assoziierende Proteine reguliert. Dies wird durch die Untersuchungen mit mutierten MyoD-Proteinen unterstützt.

Wie aus der Literatur hervorgeht, gehört eine Gruppe von MADS-Box-Transkriptionsfaktoren zu den die Myogenese verstärkenden Faktoren. Wie Molkentin et al. (1995) zeigen konnten, kooperieren die MEF-2-Proteine (eng. Myocytin enhancer factor-2) mit den myogenen bHLH-Proteinen bei der Aktivierung von muskelspezifischen Genen. Diese Kooperation zeigte einen dramatischen Anstieg der myogenen Konversion. Außerdem gibt es Hinweise dafür, daß die bHLH-Proteine über die MEF-2-DNA-Bindungsstellen Gene aktivieren können (Molkentin et al. 1995; Buchberger et al. 1994).

Es sind vier verschiedene MEF-2 Faktoren beschrieben worden (A-D), die unterschiedlich exprimiert werden. Während die Mef-2C-Expression auf Muskelzellen beschränkt ist, lassen sich MEF-2A-, MEF-2B- und MEF-2D-Transkripte in vielen Geweben und etablierten Zelllinien nachweisen. Jedoch wird vermutet, daß die DNA-bindende Aktivität der MEF-2-Proteine auf differenzierende Muskelzellen und Neurone begrenzt ist (Olson et al. 1995).

Während der Differenzierung von Skelettmyoblasten werden die vier verschiedenen MEF-2-Faktoren unterschiedlich exprimiert. MEF-2D wird als erstes in Myoblasten exprimiert, wobei bisher unklar ist, weshalb es bis zum Verlassen des Zellzyklusses keine muskelspezifische Zielgene aktiviert (Breitbart et al. 1993). MEF-2A reichert sich mit dem Beginn der Differenzierung in den Zellen an, und MEF-2C ist erst in Myotuben nachweisbar (Olson et al. 1995; Breitbart et al. 1993; Martin et al. 1993).

4.9.1 Untersuchung des Einflusses von MEF-2A auf die MyoD vermittelte Aktivierung des p75^{NGFR}-4kb-CAT

In Bezugnahme auf die MyoD vermittelte Aktivierung des p75^{NGFR}-4kb-CAT stellte sich die Frage, welchen Einfluß die MEF-2 Faktoren hierbei haben. Für das nachfolgende Experiment wurde ein Expressionskonstrukt des MEF-2A verwendet. Zudem wurde es eine zeitlang sogar für möglich erachtet, daß MEF-2A allein die Myogenese induzieren könnte, was sich nicht bestätigte (Kaushal et al. 1994).

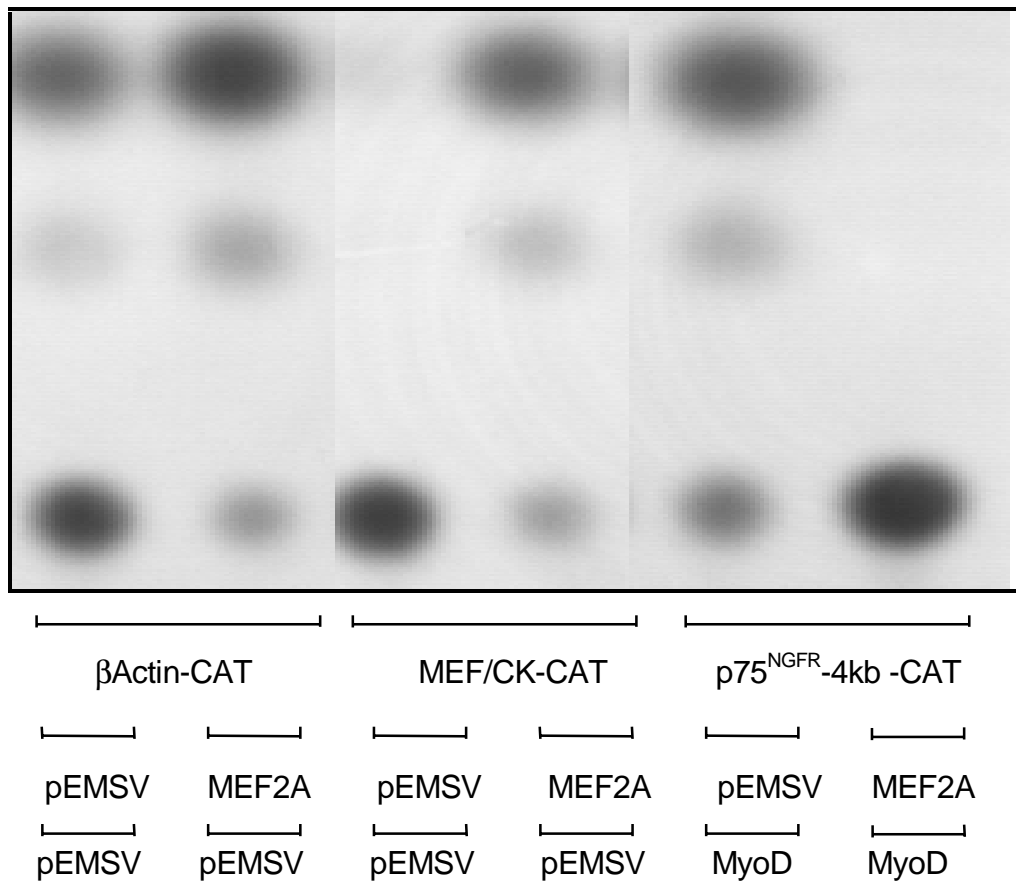


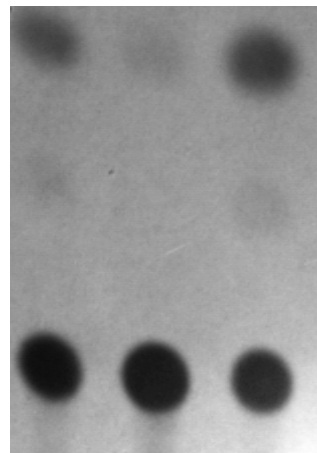
Abb. 31: CAT-Test über den Einfluß von MEF-2A auf die MyoD vermittelte Aktivierung des p75^{NGFR}-4kb-CAT.

C3H10T1/2-Zellen wurden mit 5µg MEF-CAT (Reportergen, welches zwei MEF-Bindungsstellen enthält) und 15µg eines Hühnchen-pEMSV-MEF-2A-Expressionskonstruktes, welches freundlicherweise von Frau Buchberger zur Verfügung gestellt wurde, als Positivkontrolle transfiziert. Als weitere Kontrolle wurde 1µg eines konstitutiv aktivierten β-Actin-CAT-Reportergens mit 15µg pEMSV-MEF-2A transfiziert. Zur Untersuchung der Wirkung von MEF-2A auf den MyoD-Effekt wurden jeweils 5µg p75^{NGFR}-4kb-CAT mit 10µg pEMSV-MyoD und 15µg pEMSV bzw. 10µg pEMSV-MyoD und 15µg pEMSV-MEF-2A cotransfiziert (n=3). MEF-2A inhibiert die MyoD vermittelte Aktivierung des p75^{NGFR}-4kb -CAT.

In Abb. 31 zeigt die Transfektion des β -Aktin-Reportergens in den C3H10T1/2-Zellen eine konstitutive Aktivierung, die durch die Cotransfektion mit pEMSV-MEF-2A nicht beeinflusst wird. Für das MEF-CAT-Reportergen konnte eine basale Aktivierung beobachtet werden, welche wahrscheinlich durch die in den C3H10T1/2-Zellen vorhandene MEF-2-Expression zu erklären ist. Es besteht aber auch die Möglichkeit, daß ubiquitäre Kernproteine an die MEF-Bindungsstelle binden und somit die basale Aktivität des MEF-CAT bewirken (Cserjesi und Olson 1991).

Die Transfektion des MEF-CAT mit dem pEMSV-MEF-2A-Expressionskonstrukt zeigt eine klare Aktivierung des MEF-CAT, was der Kontrolle des verwendeten pEMSV-MEF-2A Konstruktes diene.

Für die Cotransfektion von bHLH-Proteinen und MEF-Faktoren wurde bisher eine aktivierende Wirkung auf Gene beschrieben, die während der terminalen Muskel-differenzierung exprimiert werden. Dies trifft nicht auf den $p75^{NGFR}$ -4kb-CAT zu. Wie der CAT-Test zeigt, inhibiert die Cotransfektion des pEMSV-MyoD mit dem pEMSV-MEF-2A die $p75^{NGFR}$ -4kb-CAT-Aktivierung durch MyoD vollständig. Eine inaktivierende Wirkung des im Myoblastenstadium exprimierten MEF-2D konnte indes nicht beobachtet werden (Abb. 32).

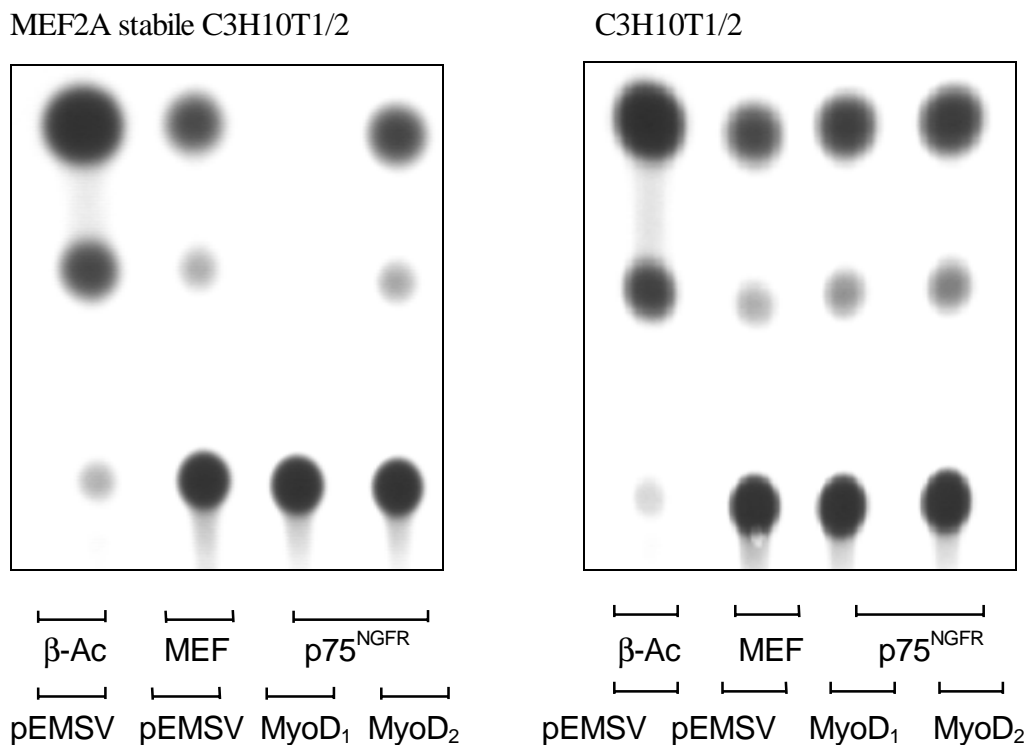


$p75^{NGFR}$ -4kb-CAT
 MyoD
 pEMSV MEF-2A MEF-2D

Abb. 32: Vergleich zwischen MEF-2A und MEF-2D

Die C3H10T1/2-Zellen wurden mit $5\mu\text{g}$ $p75^{NGFR}$ -4kb -CAT, $10\mu\text{g}$ pEMSV-MyoD und $15\mu\text{g}$ des leeren Vektors, $15\mu\text{g}$ pEMSV-MEF-2A bzw. $15\mu\text{g}$ pEMSV-MEF-2D cotransfiziert. Nach 72h wurde der CAT-Test durchgeführt ($n=3$). Im Gegensatz zu MEF-2A inhibiert MEF-2D nicht die MyoD Aktivierung des $p75^{NGFR}$ -4kb-CAT.

Zur Überprüfung des inhibierenden Effektes von MEF-2A auf die $p75^{\text{NGFR}}$ -4kb-CAT-Aktivierung durch MyoD wurde von Buchberger, eine MEF-2A stabil überexprimierende C3H10T1/2-Zelllinie freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Diese C3H10T1/2 MEF-2A Zellen wurden mit unterschiedlichen pEMSV-MyoD-Mengen und dem $p75^{\text{NGFR}}$ -4kb-CAT cotransfiziert. Da sich diese MEF-2A überexprimierende Zelllinie nicht effektiv mit der Kalziumphosphatmethode transfizieren ließ, wurde der „SuperFect“-Transfektions-Kit (Fa. Quiagen, Hilden) verwendet.



Reportergene

β-Ac	β-Actin-CAT
MEF	MEF-CAT
p75 ^{NGFR}	p75 ^{NGFR} -4kb-CAT

Abb. 33: Vergleich der Aktivierung des $p75^{\text{NGFR}}$ -4kb-CAT zwischen einer MEF-2A stabil überexprimierenden C3H10T1/2-Zelllinie und der parentalen C3H10T1/2-Zelllinie nach der Transfektion zweier unterschiedlicher MyoD-Konzentrationen.

Für die Transfektion wurden zwei unterschiedliche pEMSV-MyoD-Konzentrationen verwendet; MyoD₁ = 1 µg; MyoD₂ = 4 µg. Der $p75^{\text{NGFR}}$ -4kb-CAT und der MEF-CAT wurden mit jeweils 2 µg eingesetzt und der β-Actin-CAT mit 1 µg. MEF-2A inhibiert die MyoD-Aktivierung des $p75^{\text{NGFR}}$ -4kb-CAT konzentrationsabhängig.

Die Transfektion des β -Actin-CAT-Reportergens zeigt eine normale Aktivierung und wird nicht durch die MEF-2A-Überexpression beeinflusst (Abb. 33). Das MEF-CAT-Reportergen zeigt eine sehr hohe basale Aktivität, die keine Unterscheidung zwischen den beiden Zelllinien zuläßt.

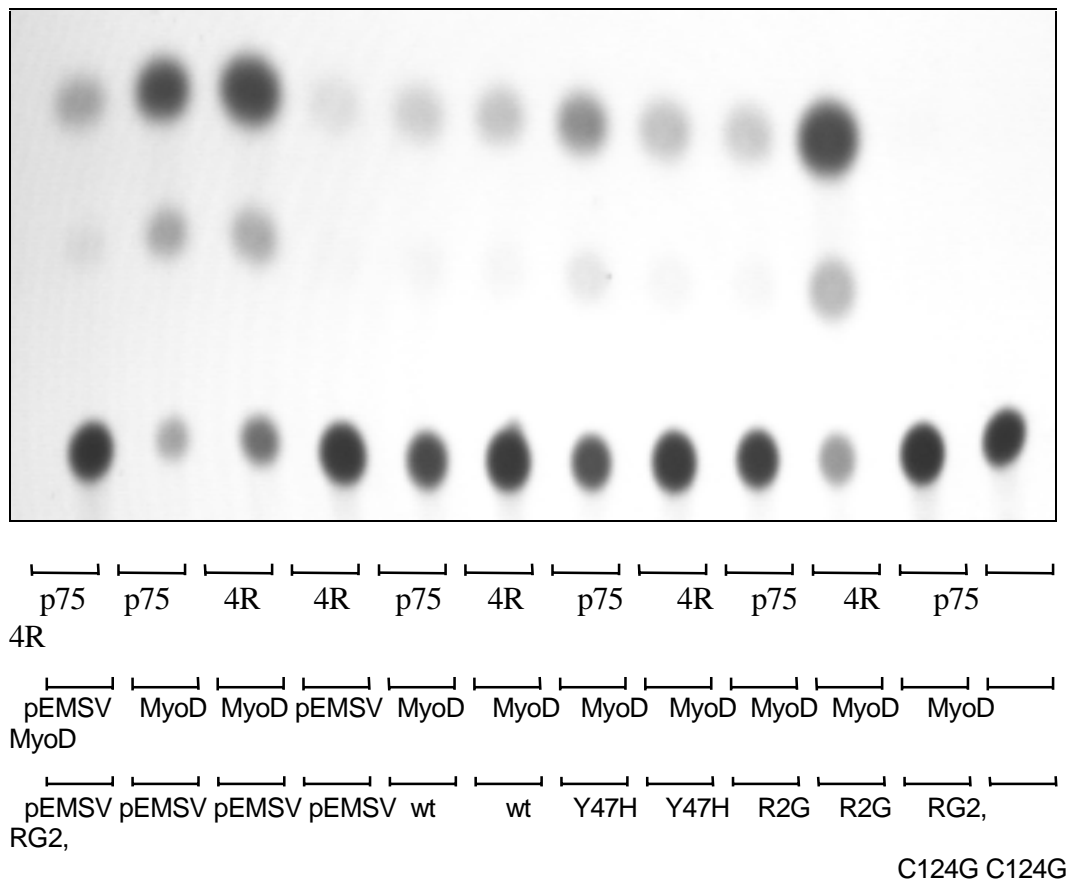
Die Transfektion von 1 μ g MyoD ist bei der C3H10T1/2-Zelllinie für eine Aktivierung des p75^{NGFR}-4kb-CAT völlig ausreichend. Bei der MEF-2A überexprimierenden Zelllinie ist bei dieser MyoD-Konzentration keine Aktivierung des p75^{NGFR}-4kb-CAT festzustellen. Eine höhere, zur Transfektion eingesetzte MyoD-Konzentration aktiviert in beiden Zelllinien den p75^{NGFR}-4kb-CAT. Damit konnte gezeigt werden, daß MEF-2A konzentrationsabhängig inhibierend auf den MyoD-Effekt wirkt. Die Inhibition des p75^{NGFR}-4kb-CAT durch MEF-2A deutet darauf hin, daß die MyoD-Spezifität Promotoren in proliferierenden Zellen zu aktivieren, durch assoziierende Proteine beeinflusst wird. MEF-2A scheint dafür besonders prädestiniert zu sein, da es sich in den Muskelzellen zu einem Zeitpunkt akkumuliert, bei welchem die p75^{NGFR}-Expression stark abnimmt (Breitbart et al. 1993; Olson et al. 1995).

Besonders interessant ist die unterschiedliche Wirkung von MEF-2A und MEF-2D auf den MyoD-Effekt, da gezeigt wurde, daß beide Proteine die konvertierende Wirkung von myogenen bHLH-Transkriptionsfaktoren auf Fibroblasten unter Differenzierungsbedingungen verstärken können. Es zeigt sich aber in dem Experiment 4.9.1, daß die beschriebene MEF-2D Inaktivität in proliferierenden Zellen (Breitbart et al. 1993) auch für die MyoD-Aktivierung des p75^{NGFR}-4kb-CAT zutrifft, und MEF-2D nicht wie MEF-2A inhibierend wirkt.

4.9.2 Untersuchung des Einflusses von E1A auf die MyoD vermittelte Aktivierung des p75^{NGFR}-4kb-CAT

Wie bereits in dem Experiment 4.2 nachgewiesen wurde, inhibiert das adenovirale E1A-Protein die p75^{NGFR}-Expression der Rattenmuskelzelllinie L6 bzw. in PC12-Zellen (Boulukos. and Ziff 1993). Worauf diese Inhibition zurückzuführen ist, ist bisher unklar. Es gibt jedoch eine Reihe von Hinweisen, daß E1A die an der Zelldifferenzierung beteiligten bHLH-Proteine auf unterschiedliche Weise inaktivieren kann. Eine vieldiskutierte Möglichkeit dieser Inhibition ist die Bindung von bHLH-proteinassoziierten pocket-Proteinen und Coaktivatoren durch E1A. Wie gezeigt werden konnte, ist die inhibierende Wirkung auf die Myogenese sowie die P75^{NGFR}-Expression in PC12-Zellen auf die erste konservierte Region (CR1) des E1A-Moleküls beschränkt (Boulukos et al. 1993; Braun et al. 1992). Diese Region ist an der Bindung des pocket-Proteins pRb, sowie dem transkriptionellen Coaktivator p300 beteiligt. Die Bindung von p300 und pRb durch E1A scheint aber für die Inhibition der Myf5 und MyoD vermittelten Transaktivierung nicht alle Möglichkeiten von E1A zu beinhalten, denn wie gezeigt wurde, inhibiert eine E1A-Mutante, welche weder p300 noch pRb binden kann, immer noch die Myogenese (Sandmöller et al. 1996).

In dem nachfolgenden Experiment wurde überprüft, ob die MyoD-Aktivierung des p75^{NGFR}-4kb-CAT durch E1A inhibiert werden kann. In einem parallelen Versuch wurde als Vergleich die Aktivierung des MCK-4R-CAT ebenfalls untersucht. Außerdem wurden verschiedene E1A-Mutanten mit unterschiedlichen Fähigkeiten, Proteine zu binden, getestet.



wt	E1A-Wild-Typ-Protein, 13S
Y47H, C124G	E1A-Mutante, welche das Zellprotein pRb nicht mehr binden kann
R2G	E1A-Mutante, welche das Zellprotein p300 nicht mehr binden kann
R2G, C124G	E1A-Mutante, welche die beiden Zellproteine Rb und p300 nicht mehr binden kann

Abb. 34: Inhibierende Wirkung von verschiedenen E1A-Mutanten auf die MyoD vermittelte Aktivierung des p75^{NGFR}-4kb-CAT und des MCK-4R-CAT.

C3H10T1/2-Zellen wurden mit 5µg p75^{NGFR}-4kb -CAT, 10µg pEMSV-MyoD und 15µg der jeweiligen RSV-E1A-Konstrukte cotransfiziert. Nach 72h wurde der CAT-Test durchgeführt (n=3). Alle RSV-E1A-Konstrukte inhibieren die MyoD Aktivierung des p75^{NGFR}-4kb -CAT. Die E1A-Mutante R2G,C124G ist im Vergleich zum p75^{NGFR}-4kb -CAT nicht in der Lage, die MyoD vermittelte Aktivierung des MCK-4R-CAT zu inhibieren.

Wie der CAT-Test in Abb. 34 zeigt, führt die Cotransfektion des pEMSV-MyoD und des RSV E1A zur Aufhebung der MyoD vermittelten Aktivierung des p75^{NGFR}-4kb-CAT und des MCK-4R-CAT.

Dies entspricht dem Ergebnis aus dem Versuch 4.2, was verdeutlicht, daß sich das Promotor-CAT-Konstrukt genauso verhält wie das Gen in der Zelle, und somit die Involvierung der myogenen bHLH-Proteine in der $p75^{\text{NGFR}}$ -Expression unterstreicht. Des weiteren ist zu beobachten ist, daß die E1A-Mutante, welche weder pRb noch p300 binden kann, die Aktivierung des $p75^{\text{NGFR}}$ -4kb-CAT durch MyoD verhindert, was bereits von Sandmöller et al. (1996) für das myogene MLC1/3-enhancer-CAT-Reportergen beschrieben wurde. Diese Mutante ist aber nicht in der Lage, die Aktivierung des artifiziellen MCK-4R-CAT zu inhibieren, was darauf hindeutet, daß die Aktivierung des MLC1/3-CAT und des $p75^{\text{NGFR}}$ -4kb-CAT nicht allein auf der Bindung der E-Box beruht, sondern kooperierende Proteine, welche vermutlich andere Sequenzen erkennen, beteiligt sind.

4.9.3 Die MyoD-VP16-Aktivierung des p75^{NGFR}-4kb-CAT wird auch durch E1A inhibiert

Wie bereits von Braun et al. (1992) gezeigt wurde, wird die Myf5-VP16 vermittelte Aktivierung des MCK-4R-CAT-Reportergens durch das adenovirale E1A-Protein nicht inhibiert. Eine Aktivierung des 15/500 Myogenin-Reportergens, sowie die Konversion von Fibroblasten wurde jedoch im Gegensatz dazu inhibiert. Um zu überprüfen, ob diese Beobachtung im gleichen Maße für den p75^{NGFR}-4kb-CAT zutrifft, und somit ein klares Unterscheidungsmerkmal zum artifiziellen MCK-4R-CAT-Reportergen zu zeigen, wurden C3H10T1/2-Zellen mit pEMSV-Myf5-VP16, MyoD-VP16 und RSV-E1A cotransfiziert.

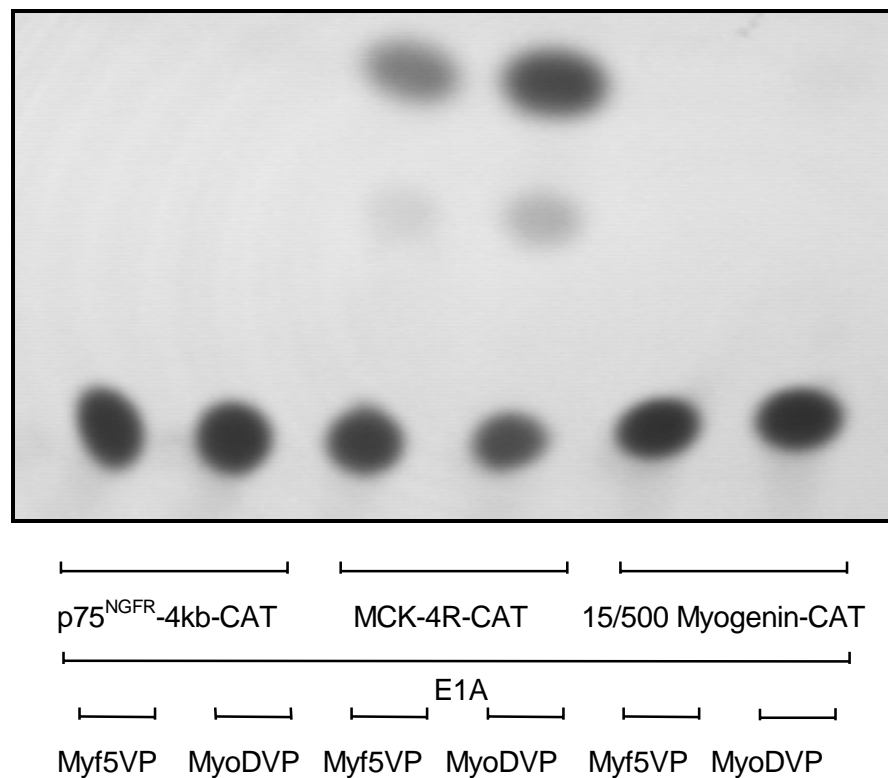


Abb. 35: Unterschiedlich inhibierende Wirkung des E1A-Proteins auf die Myf5-VP16 (Myf5VP) und MyoD-VP16 (MyoDVP) vermittelte Aktivierung des MCK-4R-CAT und des 15/500 Myogenin-CAT bzw. p75^{NGFR}-4kb-CAT.

C3H10T1/2-Zellen wurden mit 5µg des jeweiligen Reportergens, 10µg pEMSV-MyoD-VP16 bzw. Myf5-VP16 und 15µg RSV-E1A-Wildtyp cotransfiziert. Nach 72h wurde der CAT-Test durchgeführt (n=3). E1A-Protein inhibiert die Aktivierung des p75^{NGFR}-4kb-CAT und des 15/500 Myogenin-CAT, jedoch nicht die Aktivierung des MCK-4R-CAT.

Wie bereits unter 4.5 gezeigt wurde, sind die beiden Hybridmoleküle Myf5-VP16 und MyoD-VP16 fähig, den $p75^{\text{NGFR}}$ -4kb-CAT im gleichen Maße zu aktivieren. Wie der CAT-Test in Abb. 35 zeigt, wird diese Aktivierung durch die Cotransfektion mit dem E1A-Protein unterbunden. Ebenfalls davon betroffen ist die Aktivierung des 15/500 Myogenin-CAT. Im Gegensatz dazu findet keine Inhibition der Aktivierung des MCK-4R-CAT statt, wie es von Braun et al. (1992) beschrieben wurde. Dieses Ergebnis grenzt die Aktivierung des $p75^{\text{NGFR}}$ -4kb-CAT deutlich von der des MCK-4R-CAT ab, was verdeutlicht, daß die MyoD vermittelte Aktivierung des $p75^{\text{NGFR}}$ -4kb-CAT weniger auf einem kumulativen Effekt mehrerer kooperierender MyoD-Bindungsstellen beruht, sondern sich ähnlich verhält, wie die bereits für ihre biologische Relevanz beschriebenen myogenen Reportergene. Die unterschiedliche inhibierende Wirkung des E1A-Proteins auf die verschiedenen Promotoren verdeutlicht die Unabhängigkeit von einer E-Box-Bindung und die Abhängigkeit der myogenen bHLH-Proteinen von Cofaktoren bzw. kooperierenden Proteinen bei der Aktivierung von Genen (Buchberger et. al 1994).

Zusammenfassung: Das während der Differenzierung von Myoblasten zu Myotuben akkumulierende MEF-2A-Protein (Breitbart et al. 1993) inhibierte im Gegensatz zum schon in Myoblasten exprimierten MEF-2D-Protein die MyoD vermittelte Aktivierung des $p75^{\text{NGFR}}$ -4kb-CAT. Wie schon für die Expression des $p75^{\text{NGFR}}$ in L6 festgestellt wurde, inhibiert das adenovirale E1A-Protein den MyoD-Effekt auf den $p75^{\text{NGFR}}$ -4kb-CAT. Mit unterschiedlichen E1A-Mutanten konnte gezeigt werden, daß für die Inhibition einer multiplen MyoD-Bindungsstelle durch das E1A-Protein die Bindungsstelle für p300 oder pRb erforderlich ist. Im Gegensatz dazu ist zur Inhibition des $p75^{\text{NGFR}}$ -4kb-CAT und einiger anderer Promotoren noch ein weiterer Bereich im E1A-Protein fähig.

Die in ihrer Transaktivatordomäne veränderten Hybridproteine MyoD-VP16 bzw. Myf5-VP16 zeigten zwar die in der Literatur beschriebene Resistenz gegen das E1A-Protein bei der Aktivierung des MCK 4R-CAT, wurden aber an der Aktivierung des 15/500 Myogenin-CAT und des $p75^{\text{NGFR}}$ -4kb-CAT von E1A inhibiert.

Diskussion

5 Diskussion

Die Eigenschaft, daß NGF die Entwicklung und das Überleben von sensorischen und sympathischen Nerven vermittelt, ist seit 40 Jahren bekannt. NGF bindet hierbei an zwei unterschiedliche Rezeptoren, wobei der TrkA-Rezeptor überwiegend in neuronalen Zellen exprimiert wird und der p75-NGF-Rezeptor auch in nicht-neuronalen Geweben nachweisbar ist. Gerade die Funktionsweise des p75^{NGFR} und seine Wirkung auf die ihn exprimierenden Zellen gibt der Wissenschaft noch viele Rätsel auf. Einen Beitrag zur Klärung dieser Rätsel soll die vorliegende Arbeit geben.

Wie bereits in der Einleitung beschrieben wurde, zeigt das Gen des p75^{NGFR} einen hohen Konservierungsgrad unter den verschiedenen Vertebraten, was eine bedeutende Funktion vermuten läßt. Die p75^{NGFR} defizienten Mäuse haben jedoch einen, bis auf einige wenige Merkmale, fast normalen Phänotyp. Und trotzdem stellt sich die Frage: „Warum ist der p75^{NGFR} so hoch konserviert, wenn er für den Organismus eine untergeordnete Rolle spielt, da doch bekannt ist, daß nicht essentielle Gene einer starken Mutationsrate unterliegen?“ (Lewin 1988). Auch eine andere Frage gewinnt dabei an Bedeutung: „Warum wird ein für Nervenfasern offensichtlich essentielles Wachstumsfaktor/Rezeptor-System auch von nicht neuronalen Zellen und dann für welchen Zweck verwendet?“. Um diesen Fragen nachgehen zu können, wurde ein vereinfachtes Untersuchungssystem ausgewählt, welches sehr viel weniger komplex ist als Knockout-Experimente und dessen Parameter besser überschaubar sind. Hierfür bot sich die p75^{NGFR} exprimierende, etablierte Mausmuskelzelllinie C2C12 (Yaffee und Saxel 1977) an, da diese u. a. die Fähigkeit hat, *in vitro* zu Myotuben zu differenzieren. Dies ermöglichte es die Funktion des p75^{NGFR} in nicht- neuronalen Zellen zu untersuchen.

5.1 Die Überexpression des $p75^{NGFR}$ führt zur beschleunigten Differenzierung in C2C12-Zellen

In der Literatur sind eine Reihe von nicht-neuronalen Geweben beschrieben, in denen der $p75^{NGFR}$ exprimiert wird (siehe Tab. 3). Ihnen allen gemeinsam ist, daß der $p75^{NGFR}$ nur transient exprimiert wird. Diese kurzzeitige Expression beginnt meistens während der Wanderschaft von Vorläuferzellen zu ihren Zielgeweben und endet mit dem Beginn der terminalen Differenzierung (von Bartheld et al. 1991; Wheeler und Bothwell 1992; Durbeej et al. 1993). Eine ähnliche temporale Expression des $p75^{NGFR}$ konnte bei Regenerationsprozessen beobachtet werden (Byers et al. 1990; Baron et al. 1994). Baron et al. (1994) konnten zeigen, daß während der Skelettmuskelentwicklung bei menschlichen Föten der $p75^{NGFR}$ zwischen der 12. und 22. Woche auf Myoblasten exprimiert wird. Auf Muskelfasern von normalen Erwachsenen hingegen konnten keine $p75^{NGFR}$ -Rezeptoren nachgewiesen werden. Eine Ausnahme sind jedoch regenerierende Muskeln von an Muskeldystrophie Duchenne erkrankten Patienten, auf deren Muskelfasern sich der $p75^{NGFR}$ immunhistochemisch nachweisen läßt, wobei es sich hier möglicherweise um eine Anfärbung von Satelliten Zellen handelt.

Erste Ergebnisse von NGF behandelten Muskeln bzw. Muskelzellen lassen eine Involvierung des $p75^{NGFR}$ bei der Myogenese vermuten. Wie Radeva (1978) bei Wassermolch-Larven zeigen konnte, führt eine übermäßige NGF-Applikation deutlicher zu einer beschleunigten Strukturierung der Muskeln, als bei nicht mit NGF behandelten Larven.

Die Analyse des Expressionsmusters der beiden bekannten NGF-Rezeptoren ergab, daß nur der $p75^{NGFR}$ in einem zeitlich begrenzten Bereich während der Muskelentwicklung exprimiert wird (Raivich et al. 1985, Ernfors 1991). Wheeler und Bothwell (1992) konnten zeigen, daß zur gleichen Zeit, in der der $p75^{NGFR}$ in Muskelzellen exprimiert wird, auch NGF in den gleichen Arealen nachzuweisen ist. All diese Daten waren Anlaß genug, eine funktionelle Involvierung des $p75^{NGFR}$ während der Muskelentwicklung zu vermuten und zu untersuchen.

Die für die Experimente verwendete Mausmuskelzelllinie C2C12 exprimiert den $p75^{NGFR}$ nur sehr schwach im undifferenzierten Zustand. Gleichzeitig sezernieren die C2C12-Zellen größere Mengen an NGF ins Medium, welches sich bei Hinterwurzelganglien als biologisch aktiv erwies.

Wie von Radeva (1978) bei Molch-Larven bereits beobachtet wurde, zeigten die C2C12-Zellen ebenfalls eine von der NGF-Konzentration abhängige, erhöhte Anteil von differenzierten Zellen (mündliche Mitteilung von Seidl).

Durch die Überexpression des $p75^{NGFR}$ in den C2C12-Zellen sollte diese Beobachtung unterstützt und verdeutlicht werden. Mit der Expression einer $p75^{NGFR}$ Anti-Sinn-RNA in den C2C12-Zellen sollte versucht werden, die Translation des $p75^{NGFR}$ zu unterbinden, um eine weitere Untersuchungsmöglichkeit der $p75^{NGFR}$ -Funktion in nicht-neuronalen Zellen verfolgen zu können.

Die Expression von Anti-Sinn-RNA in eukaryotischen Zellen wurde schon in Tomatenpflanzen als aprobat Mittel zur spezifischen Genregulation eingesetzt (Smith et al. 1988), so daß für die Untersuchung der Funktion des $p75^{NGFR}$ ein $p75^{NGFR}$ Anti-Sinn-RNA produzierendes Konstrukt verwendet wurde. Unter einer Vielzahl von getesteten Klonen konnte nur ein $p75^{NGFR}$ -Anti-Sinn-RNA exprimierender Klon isoliert werden.

Der $p75^{NGFR}$ -Anti-Sinn exprimierende C2C12-Zell-Klon zeigte keinerlei Tendenzen zu einer muskelspezifischen Differenzierung. Eine MyoD- oder Desmin-Expression, wie in den parental C2C12-Zellen, ist ebenfalls nicht nachweisbar. Die durchgeführten Untersuchungen lassen jedoch nicht den endgültigen Schluß zu, daß die Inhibition der $p75^{NGFR}$ -Expression in diesen Zellen die Ursache dafür ist. Es besteht ebenso die Möglichkeit, daß die $p75^{NGFR}$ -Anti-Sinn-RNA unspezifisch ein an der Muskeldifferenzierung beteiligtes Gene blockiert.

Daß ein Zusammenhang zwischen der $p75^{NGFR}$ -Anti-Sinn-RNA und der Inhibition der Differenzierung besteht, zeigte die Reversion der Anti-Sinn exprimierenden Zellen durch die Transfektion eines $p75^{NGFR}$ -Sinn-Konstruktes, welches bei einem isolierten Klon die Möglichkeit zur Differenzierung wieder herstellte (Rescue).

Die beiden voneinander unabhängig ausgewählten $p75^{NGFR}$ überexprimierenden Klone zeigten beide eine beschleunigte Differenzierung im Vergleich zu Kontroll-Zellen bei einem tendenziell gleichen Wachstum der verschiedenen Zellen.

Welche Wirkungsweise des $p75^{NGFR}$ für diese beschleunigte Differenzierung zugrunde liegt, ist bisher unklar. Es gibt aber in der Literatur einige mögliche Hinweise, mit dem die gemachte Beobachtung erklärt werden könnte.

Zum einen ist eine direkt vom $p75^{NGFR}$ nach erfolgter NGF-Bindung vermittelte, beschleunigte Differenzierung der Zellen denkbar. Hierbei könnte die $p75^{NGFR}$ -

Signaltransduktion über Ceramide eine wichtige Rolle spielen (Übersichtsartikel Kaplan et al. 1997; Carter et al. 1996; Casaccia-Bonofil et al. 1996).

Zum anderen könnte die verstärkte Expression von Zelladhäsionsmolekülen eine beschleunigte Differenzierung bewirken (Bothwell 1991). Wie Itoh et al. (1995) zeigen konnten, kann das neuronale Zelladhäsionsmolekül NILE/L1 bei PC12-Zellen unabhängig von TrkA über die Bindung von NGF an den $p75^{NGFR}$ induziert werden. Welche Wirkung die Überexpression solcher Zelladhäsionsmoleküle auf die Muskeldifferenzierung hat, zeigte die Überexpression von NCAM in C2-Myoblasten (Dickson et al. 1990).

Die NCAM überexprimierenden Klone zeigten die gleiche beschleunigte Differenzierung, wie sie bei der $p75^{NGFR}$ -Überexpression beobachtet wurde. Es besteht daher die Möglichkeit, daß die Überexpression des $p75^{NGFR}$ zu einer vermehrten Anzahl von Zelladhäsionsmolekülen führt, bzw. ein direkter Zusammenhang zwischen der $p75^{NGFR}$ -und NCAM-Expression besteht (Prentice 1987; Doherty et al. 1988). Dies wird durch die Beobachtung von Wheeler und Bothwell (1992) unterstützt, die zeigen konnten, daß eine enge Korrelation im Expressionsmuster der beiden Moleküle auch während der Muskelentwicklung besteht.

Eine weitere in Betracht kommende Möglichkeit wäre die von Seidl (mündliche Mitteilung) erwähnte proliferative Wirkung des $p75^{NGFR}$ auf C2C12-Myoblasten, die zu einem schnelleren Wachstum der Zellen in Kultur führt und sich in einer beschleunigten, durch die Kontaktinhibition des Zellzyklus verursachten Differenzierung manifestiert. Dieser proliferative Effekt konnte jedoch in dieser Arbeit nicht beobachtet werden.

Daß der $p75^{NGFR}$ einen stimulierenden Einfluß auf die C2C12-Zellen hat, zeigten nachfolgende Experimente von Seidl mit den in dieser Arbeit hergestellten Überexpressionsklonen (siehe Abb.36).

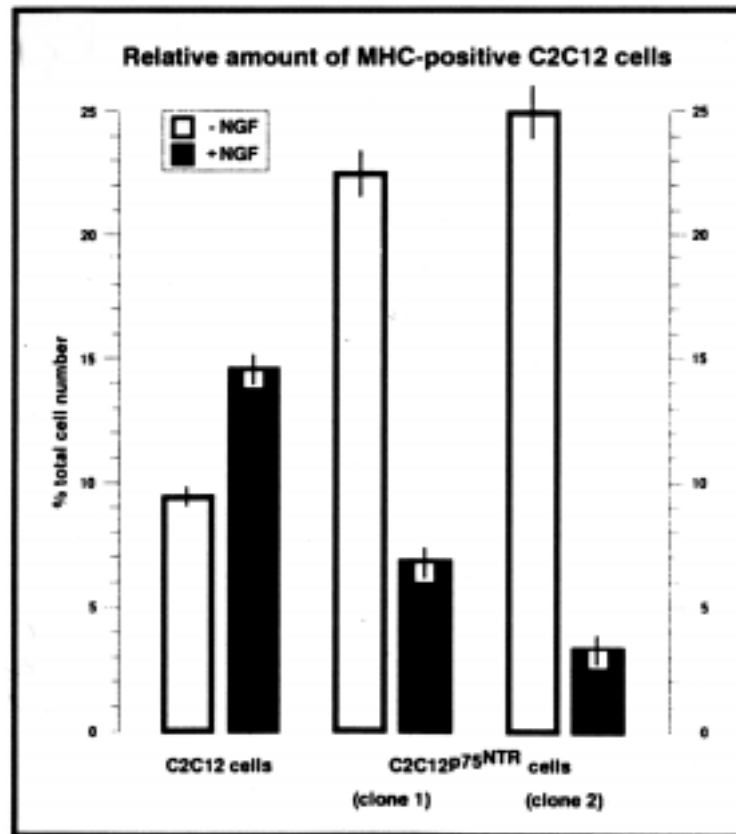


Abb. 36: Gegenteiliger Effekt bei C2C12-Zellen nach NGF-Zugabe (Seidl).

Wie die Graphik in Abb. 36 zeigt, führt die Zugabe von NGF zu den parentalen C2C12-Zellen, welche den $p75^{\text{NGFR}}$ bei beginnender Konfluenz herunterregulieren, zu einem Anstieg der MHC-positiven Zellen (C2C12, schwarze Säule). Ein darüber hinaus noch höherer Anteil von MHC-positiven Zellen ohne Zugabe von NGF ist bei den C2C12-Zellen zu beobachten, die den $p75^{\text{NGFR}}$ überexprimieren und ihre eigene NGF-Expression zu Beginn der Konfluenz der Zellen herunterregulieren (Klone 1 und 2, weiße Säulen). Wenn wie im Fall der Überexpressionsklone der $p75^{\text{NGFR}}$ nicht mehr herunterreguliert werden kann und die natürliche NGF-Sezernierung durch die Zugabe von NGF künstlich verlängert wird, zeigen die den $p75^{\text{NGFR}}$ konstitutiv exprimierenden Zellen eine deutliche Reduktion der Differenzierung (Klone 1 und 2, schwarze Säulen). Es ergibt sich daraus, daß die Expression des NGF/ $p75^{\text{NGFR}}$ -Systems vor dem Konfluentwachsen der C2C12-Muskelzellen eine die Differenzierung unterstützende Funktion hat. Dieses System muß jedoch ab einem bestimmten Punkt abgeschaltet werden, da es sonst der Differenzierung entgegen wirkt, was durch die transiente Expression in den C2C12-Zellen (diese Arbeit), sowie während der Embryonalentwicklung gegeben ist (Baron et al. 1994). Die inhibitorische Wirkung von

NGF auf die $p75^{\text{NGFR}}$ überexprimierenden C2C12-Zellen könnte mit dem beschriebenen proliferativen Effekt bzw. mit einer mitogenen Wirkung erklärt werden. Da aber dieser Effekt in dieser Arbeit nicht beobachtet werden konnte, kommt eine Überlegung in Betracht, die NGF als einen vom $p75^{\text{NGFR}}$ vermittelten Überlebensfaktor (survival-faktor) darstellt.

NGF könnte die Lebensbedingungen für die C2C12 Zellen in Kultur in der Art verbessert, daß nach dem Abschalten der zelleigenen NGF Expression mehr Zellen das gesamte Programm der Differenzierungsprozesse durchlaufen können. Für den $p75^{\text{NGFR}}$ -Anti-Sinn exprimierenden Klon würde das bedeuten, daß er zwar proliferieren kann, z.B. angeregt durch das FGF-2/FGFR-System, ihm jedoch das NGF/ $p75^{\text{NGFR}}$ - Signal fehlt, ohne das die C2C12-Myoblasten den zur Differenzierung erforderlichen Zustand nicht erreichen können. Erste Experimente von Seidl unterstützen die Überlegung, daß NGF über den $p75^{\text{NGFR}}$ als survival-Faktor wirkt. Hierbei hat sich gezeigt, daß Zellen des $p75^{\text{NGFR}}$ Anti-Sinn Klons, die in nur mit NGF supplementiertem Medium kultiviert wurden, sich deutlich schneller und häufiger von der Zellkulturplatte ablösten, als die parentalen bzw. die $p75^{\text{NGFR}}$ -Überexpressions-klone. Dies läßt vermuten, daß die $p75^{\text{NGFR}}$ -Anti-Sinn-Zellen aufgrund des über den $p75^{\text{NGFR}}$ vermittelten, fehlenden survival-Signals absterben, was bereits für einige neuronale Zellen beschrieben wurde (Levi-Montalcini et al. 1968; Thoenen et al. 1980; Thoenen et al. 1987). In den $p75^{\text{NGFR}}$ -Knockout Mäusen stehen den Muskelzellen eine ganze Reihe von kompensatorischen Ersatzsysteme zur Verfügung, so daß, wie beschrieben wurde, keine Abnormitäten an der Muskulatur dieser Mäuse festgestellt wurden (Lee et al. 1992).

5.2 *Transin wird in L6 Muskelzellen exprimiert*

Die Expression des $p75^{\text{NGFR}}$ in Muskelzellen ist zeitlich begrenzt auf das Auswandern der Skelettmuskelvorläuferzellen bis zur Differenzierung zu Myotuben bzw. auf die Regeneration von Muskelfasern (Ernfors et al. 1991; Wheeler und Bothwell 1992). Während dieser Zeit kommt es zu einem extensiven Umformen der extrazellulären Matrix (ECM), an der Metalloproteinasen (MMP) beteiligt sind (Chen et al. 1977).

Es sollte daher untersucht werden, ob es einen Zusammenhang zwischen der Expression des $p75^{\text{NGFR}}$ und sezernierten ECM-degradierenden Metalloproteinasen während der Myogenese gibt. Daß dies grundsätzlich möglich ist, konnten Herrmann et

al. (1993) zeigen, die nach der Bindung von NGF an den $p75^{\text{NGFR}}$ in Melanoma-zellen die Stimulierung einer 72kDa TypIV Collagenase und ein verstärktes invasives Verhalten der Zellen dokumentieren konnten. Des weiteren konnte die Induktion der Metalloproteinase Transin durch NGF in PC12-Zellen gezeigt werden (Machida et al. 1989).

Wie die Ergebnisse der zymographischen Untersuchung der sezernierten Proteinasen ergaben, konnte kein Unterschied zwischen den mit NGF behandelten und den nicht mit NGF behandelten Zellen, bzw. zwischen den $p75^{\text{NGFR}}$ exprimierenden und nicht exprimierenden Zellen gezeigt werden. Als interessantes Ergebnis dieses Experiments ist zu bemerken, daß die Fibroblastenzelllinie C3H10T1/2 sich in ihrem Spektrum der sezernierten Proteinasen nicht von der Myoblastenzelllinie C2C12 unterscheidet.

Im Gegensatz dazu unterscheidet sich die Muskelzelllinie L6 in ihren sezernierten Proteinasen von den C3H10T1/2- und C2C12-Zellen in einer 92kDa großen Proteinase, die sich bei den L6-Zellen nicht nachweisen läßt.

Wie Guérin et al. (1995) zeigen konnten, exprimieren humane Satelliten-Zellen aus dem Biceps-Muskel im Gegensatz zu isolierten Fibroblasten ebenfalls keine 92kDa Proteinase.

Wie die Untersuchungen der einzelnen Zelllinien auf eine Induktion der Metalloproteinase Transin mittels RT-PCR ergab, wird Transin nur von der Muskelzelllinie L6 exprimiert. Diese Expression läßt sich aber nicht, wie bei der PC12-Zelllinie, durch die Zugabe von NGF verändern.

5.3 Regulation der $p75^{\text{NGFR}}$ -Expression

Nachdem von verschiedenen Autoren die transiente Expression des $p75^{\text{NGFR}}$ während der Myogenese beschrieben wurde, sprechen einige Daten für die Involvierung des $p75^{\text{NGFR}}$ in die Vorgänge der Myogenese (Wheeler und Bothwell 1992; Ernfors et al. 1991; Heuer et al. 1990).

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse unterstützen diese Auffassung. Mit der Untersuchung der Regulation des $p75^{\text{NGFR}}$ -Gens gibt es eine weitere Möglichkeit, Rückschlüsse auf die Funktion des $p75^{\text{NGFR}}$ ziehen zu können bzw. seine Stellung während der Muskeldifferenzierung darzustellen.

Die Expression des $p75^{\text{NGFR}}$ in der C2C12-Zelllinie wurde nur in undifferenzierten Myoblasten nachgewiesen und konnte in differenzierten Myotuben nicht mehr gezeigt

werden (mündliche Mitteilung von Seidl). Somit sollte in dem ersten Experiment zur Untersuchung der $p75^{\text{NGFR}}$ -Regulation festgestellt werden, zu welchem Zeitpunkt während der Kultivierung der C2C12-Zellen die $p75^{\text{NGFR}}$ -Expression endet. Es konnte gezeigt werden, daß der $p75^{\text{NGFR}}$ von den Muskelzelllinien C2C12 und L6 exprimiert und von beiden bei der gleichen Zelldichte herunterreguliert wird. Die Vermutung liegt daher sehr nahe, daß der $p75^{\text{NGFR}}$ in Abhängigkeit zur Zelldichte bzw. des Zellzyklus in Muskelzellen reguliert wird.

Diese sich auf proliferierende Zellen beschränkende $p75^{\text{NGFR}}$ -Expression scheint jedoch nicht bei allen $p75^{\text{NGFR}}$ exprimierenden Zellen stattzufinden, da der $p75^{\text{NGFR}}$ in neuronalen Zellen auch von sich nicht mehr teilenden Zellen exprimiert wird (Wyatt und Davies 1993; Davies et al. 1995). Es gibt daher offensichtlich sehr unterschiedliche Regulationsmechanismen zwischen der $p75^{\text{NGFR}}$ -Expression im Muskel- und im Nervengewebe, wie auch die unterschiedlichen Expressionsmuster verschieden langer Promotorkonstrukte in transgenen Mäusen gezeigt haben (Huber et al. 1995).

Wie in dieser Arbeit vorgestellt wurde, verstärkt die Zugabe zum Kulturmedium des auf Myoblasten stark mitogen wirkende Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF-2) die Expression des $p75^{\text{NGFR}}$ in der Muskelzelllinie C2C12. Den gleichen Effekt konnten Taiji et al. (1992) an der Neuroblastoma-Zelllinie CHP100 zeigen, so daß zu bemerken ist, daß bei der $p75^{\text{NGFR}}$ -Regulation in Muskelzellen und Nervenzellen auch gemeinsame Mechanismen existieren.

Des weiteren fällt bei der Hochregulierung des $p75^{\text{NGFR}}$ nach der FGF-2 Zugabe in C2C12-Zellen auf, daß es auch hier mit zunehmender Zelldichte zu einer Herunterregulierung kommt, allerdings erst bei höheren Zelldichten. Die Zugabe von FGF-2 vermag trotz seiner mitogenen Wirkung diesen Vorgang nicht zu verhindern. Dies zeigt, daß FGF-2 zwar die Regulation der $p75$ -Expression beeinflussen kann, jedoch keine direkte Abhängigkeit besteht, da es bei den C2C12-Zellen zu keiner Herunterregulierung des FGFR1 kommt, und deshalb exogen zugeführtes FGF-2 an den vorhandenen Rezeptor hätte binden können. Es könnte der FGF-Effekt auf die $p75^{\text{NGFR}}$ -Expression mit seiner proliferativen Wirkung auf die Zellen erklärt werden. Die funktionelle Bedeutung des $p75^{\text{NGFR}}$ ist daher vor dem Erreichen der Konfluenz der Zellen bzw. vor der terminalen Differenzierung zu suchen. Die Regulation des $p75^{\text{NGFR}}$ durch FGF-2 scheint hingegen einem übergeordneten Mechanismus zu unterliegen, der mit einer zunehmenden Zelldichte bzw. Zellkontakt zum Tragen kommt und auch die

verstärkte Expression des $p75^{\text{NGFR}}$ durch FGF-2 beendet. In diesem Zusammenhang ist aus der Literatur zu berichten, daß in humanen Muskeln von gesunden Erwachsenen keine immunhistochemische Darstellung des $p75^{\text{NGFR}}$ möglich ist. Bei der Untersuchung von Muskelfasern, die von männlichen Jugendlichen stammten, die an der Duchenne-Muskeldystrophie erkrankt sind, konnte jedoch auf sich regenerierenden Muskeln, wahrscheinlich auf Satellitenzellen, das Protein sowie die mRNA nachgewiesen werden (Baron et al. 1994). Bei dieser X-chromosomal-rezessiven Erkrankung, welche durch eine Mutation des Gens entsteht, das für die Produktion von Dystrophin verantwortlich ist, kommt es zu einer ständigen Degeneration und nur teilweisen Regeneration der Muskeln, was zumeist im Alter zwischen 18 und 20 Jahren zum Tod der Erkrankten führt. Wie die Untersuchungen an einem Mausmodel (mdx-Maus) der Duchenne-Muskeldystrophie gezeigt wurde, kommt es zu einer Colokalisation von FGF-2 und Myogenin in jungen Myotuben. Wie die Autoren weiter anmerkten, könnte es hier zu einer intrazellularen Wirkung von FGF-2 kommen, da keine FGF-Rezeptoren nachgewiesen wurden (Garrett und Anderson 1995). Für die Regulation des $p75^{\text{NGFR}}$ in der Muskulatur bedeutet dies, daß der $p75^{\text{NGFR}}$ auch an Regenerationsprozessen beteiligt ist.

Wie der zelllichteabhängige $p75^{\text{NGFR}}$ -Expressionsverlauf in den C2C12- und L6-Zellen bzw. die Hochregulierung des $p75^{\text{NGFR}}$ durch den mitogenen Faktor FGF-2 vermuten ließ, ist die Aktivierung des Zellzyklusses nicht alleine für die Expressionsregulation des $p75^{\text{NGFR}}$ in Muskelzellen verantwortlich. Die Fähigkeit zur Differenzierung ist eine weitere Voraussetzung für die $p75^{\text{NGFR}}$ -Expression, was durch den Anstieg der $p75^{\text{NGFR}}$ -Expression innerhalb der ersten beiden Zelldichten gezeigt wurde, bzw. die völlige Repression des $p75^{\text{NGFR}}$ durch das adenovirale E1A-Protein bestätigt wurde. Es ist daher anzunehmen, daß der $p75^{\text{NGFR}}$ eine die Differenzierung der Zellen vorbereitende Funktion in Form eines survival-Faktors einnimmt, was ihn zu einem Prädifferentierungsmarker zumindest für Muskelzellen macht. Diese Annahme läßt sich aber durchaus auch auf andere mesenchymale Zellsysteme übertragen, wie z.B. auf die Nieren- und Lungentwicklung (Durbecq et al. 1993; Bothwell 1991).

Die Ergebnisse dieser Arbeiten bestätigten die Hypothese der Involvierung des $p75^{\text{NGFR}}$ innerhalb der Myogenese. Die Daten zur Regulation des $p75^{\text{NGFR}}$ zeigen, daß die

Differenzierungskompetenz einer myogenen Zelle für die $p75^{\text{NGFR}}$ -Expression unerlässlich ist.

Es ist daher zu fordern, daß die Regulation des $p75^{\text{NGFR}}$ durch Transkriptionsfaktoren vermittelt wird, die an der Differenzierung beteiligt sind. In einer ersten Überlegung schienen die Gene der MyoD-Familie nicht dafür infrage zu kommen, da von Chimarello et al. (1995) gezeigt wurde, daß bHLH-Proteine (ME1a und ME1b) an der Suppression des $p75^{\text{NGFR}}$ beteiligt sind. Es stellte sich aber dann heraus, daß MyoD ein 4kb großes Promotor-CAT-Konstrukt aktivieren kann.

Um ein transfektionsbedingtes Ereignis, welches die Aktivierung auslösen könnte, auszuschließen, bzw. die MyoD-spezifische Aktivierung besser erklären zu können, wurde ein konditionell aktivierbares MyoD-ER- und Myf5-ER-Konstrukt verwendet. Diese Konstrukte erlauben es, Untersuchungen vorzunehmen, die einige Tage nach der Transfektion, erst nach der Zugabe eines Aktivators, einen aktiven Transkriptionsfaktor freisetzen. Der direkte Vergleich zwischen mit Aktivator behandelten Transfektionsansätzen mit denen ohne Aktivator zeigten, daß die beobachtete Aktivierung des $p75^{\text{NGFR}}$ -4kb-CAT direkt durch den Transkriptionsfaktor MyoD vermittelt wird.

Als sehr interessant ist dabei zu bemerken, daß weder ein verwendetes Expressionsplasmid, noch ein konditionell aktivierbares Genkonstrukt des myogenen Transkriptionsfaktors Myf5 in der Lage war, den $p75^{\text{NGFR}}$ -4kb-CAT zu aktivieren. Dies deutete auf einen möglichen Unterschied der beiden Proteine in ihrer Fähigkeit, Promotoren von Genen zu transaktivieren, hin. Wie der gegenseitige Austausch von MyoD und Myf5 zeigte, können sich beide Gene innerhalb der Muskeldifferenzierung ersetzen, sind also redundant zueinander (Rudnicki et al. 1992; Braun et al. 1992).

Es konnte jedoch gezeigt werden, daß sich beide Transkriptionsfaktoren bei der Aktivierung des Myogeningens in NiH3T3-Fibroblasten unterscheiden (Ragge 1996). Ein weiterer Hinweis für die unterschiedliche Aktivierung von Genen durch die beiden Transkriptionsfaktoren Myf5 und MyoD ist, daß MyoD zwar seinen eigenen Promotor aktivieren kann, jedoch Myf5 dies nicht vermag (Braun und Arnold 1996). Dies gab einen ersten Hinweis für die Existenz zweier separater Zelllinien in denen die beiden Transkriptionsfaktoren jeweils exprimiert werden.

Die Experimente mit in der Transaktivatordomäne veränderten und dadurch in ihrer transaktivierenden Wirkung verstärkten Myf5-VP16 und MyoD-VP16 Expressions-

konstrukten zeigten, daß Myf5-Wildtyp durchaus in der Lage ist, die in dem p75^{NGFR}-4kb-CAT enthaltenen Promotorsequenzen zu erkennen, jedoch nicht fähig ist, diesen zu aktivieren. Dies könnte einerseits mit einer geringeren transaktivierenden Fähigkeit von Myf5 zusammenhängen, zum anderen muß man aber auch in Betracht ziehen, daß Myf5 zwar an den p75^{NGFR}-4kb-CAT binden kann, jedoch weitere, die Transaktivator-domäne betreffende Komponenten fehlen könnten, die es Myf5 dadurch nicht ermöglichen, das Promotor-CAT-Konstrukt zu aktivieren.

Die Kooperation von myogenen Transkriptionsfaktoren und zum Teil ubiquitären Proteinen ist schon für einige Moleküle bekannt. So ist z.B. gezeigt worden, daß das bHLH-Protein E12, welches ein E2A-Genprodukt ist, an die HLH-Domäne von MyoD assoziiert und die aktivierende Wirkung von MyoD um ein vielfaches verstärkt (Lassar et al. 1991). Für die Aktivierung des p75^{NGFR} durch MyoD stellte sich die Frage, ob diese durch einen assoziierten Transkriptionsfaktor, wie z.B. E12, vermittelt wird, oder es sich wirklich um eine direkte Aktion von MyoD handelt. Wie das Experiment 4.8 zeigte, ist E12 alleine nicht in der Lage, den p75^{NGFR}-CAT zu aktivieren.

Dieses Experiment zeigte aber noch nicht, ob die Assoziation von E12, wie bereits für die Bindung der E-Box in myogenen Promotoren beschrieben wurde (Lassar et al. 1991), auch für die Aktivierung des p75^{NGFR}-4kb-CAT notwendig ist.

5.4 MyoD aktiviert den p75^{NGFR}-4kb-CAT in proliferierenden Zellen

Die Expression des p75^{NGFR} beschränkt sich in Muskelzellen auf den zeitlichen Bereich, der den terminalen Differenzierungsprozessen vorgeschaltet ist. Deshalb ist für eine Aktivierung oder Verstärkung der p75^{NGFR}-Expression durch MyoD zu fordern, daß diese Funktion von MyoD innerhalb des Myoblastenstadiums bzw. davor zum Tragen kommt, also zu einem Zeitpunkt, wo sich die Zellen in der Teilungsphase befinden.

Tatsächlich muß eine solch frühe muskeldeterminierende Funktion von den beiden myogenen Transkriptionsfaktoren Myf5 und MyoD ausgehen. Denn wie in Myf5/MyoD-Doppel-Knockout-Mäusen gezeigt werden konnte, enthalten diese keine Myoblasten. Bei dem Knockout des Myogenin-Gens hingegen sind ausreichend viele myogene Zellen an den natürlichen Positionen vorhanden, welche aber nicht mehr differenzieren.

Es ist daher zu vermuten, daß die Transkriptionsfaktoren Myf5 und MyoD in den wandernden Vorläuferzellen die Expression von verschiedenen Genen beeinflussen.

Um feststellen zu können, ob MyoD den p75^{NGFR}-4kb-CAT zu diesem frühen Zeitpunkt aktivieren kann, wurde die MyoD vermittelte Aktivierung des p75^{NGFR}-4kb-CAT mit der Aktivierung des 15/500 Myogenin-Reportergens zu unterschiedlichen Zeitpunkten gemessen. Wie in dem Experiment gezeigt werden konnte, wird der p75^{NGFR}-4kb-CAT bereits nach 24h aktiviert, wo die Zellen noch subkonfluent waren und in Wachstumsmedium (GM) kultiviert wurden. Zu diesem Zeitpunkt konnte keine Aktivierung des 15/500 Myogenin-CAT beobachtet werden. Daraus ergibt sich, daß MyoD durchaus die Möglichkeit hat, die Expression des p75^{NGFR} in sich teilenden Zellen zu beeinflussen, oder aber zumindest der p75^{NGFR}-4kb-CAT Sequenzen enthält, die durch MyoD und assoziierte weitere Proteine zu einer Aktivierung führen. Unterstützt wird dieses Ergebnis von Eckner et al. (1996), der zeigen konnte, daß bereits in proliferierenden Myoblasten ein Komplex aus MyoD und dem Coaktivatorprotein p300 nachzuweisen ist. Wie die Ergebnisse der Inhibition der MyoD-Aktivierung des p75^{NGFR}-4kb-CAT durch das adenovirale E1A-Protein bestätigen (4.9.1), ist dies eine Grundvoraussetzung für die MyoD vermittelte p75^{NGFR}-4kb-CAT-Aktivierung.

5.5 MyoD erkennt einzelne E-Box im p75^{NGFR}-Promotor

Die Sequenzanalyse des p75^{NGFR}-Promotors zeigte innerhalb der ersten ca. 2000bp fünf potentielle MyoD-Bindungsstellen. Eine dieser E-Boxen, welche innerhalb der ersten 400bp stromaufwärts vom Startcodon zu finden ist, wird von dem bHLH-Protein ME1a und ME1b erkannt und führt zur Inhibition des p75^{NGFR} in PC12-Zellen (Chiaromello et al. 1995). Ein Reportergen, welches diese ersten 0,4kb des p75^{NGFR} Promotors enthielt, zeigte weder bei Chiaromello et al. (1995) noch in dieser Arbeit eine Beeinflussung durch MyoD, ist jedoch durch NeuroD aktivierbar (mündliche Mitteilung von T. Neuman). Die von MyoD verwendete Aktivierungsregion im p75^{NGFR}-4kb-CAT ist daher oberhalb der 400bp zu vermuten. Des weiteren ist zu bemerken, daß auch bei diesem Experiment abermals deutlich wird, daß die verschiedenen bHLH-Proteine zwar die gleiche Consensussequenz haben, jedoch Mechanismen existieren müssen, die eine Diskriminierung der einzelnen E-Boxen vornehmen.

Wie die Untersuchung weiterer p75^{NGFR}-Promotorfragmente ergab, läßt sich eine MyoD-Aktivierung auf den Bereich von -393bp bis -620bp einschränken. In dieser

Region konnte eine einzelne E-Box identifiziert werden. Die Vermutung, daß es sich bei der MyoD-Aktivierung der p75^{NGFR}-CAT-Konstrukte um einen kooperativen Effekt zwischen MyoD und einem anderen DNA-bindenden Protein handelt, wie z.B. beim Myogenin- und anderen Promotoren beschrieben wurde, ist somit zu fordern, da Weintraub et al. (1990) zeigen konnten, daß eine einzelne E-Box durch MyoD nicht aktiviert werden kann.

5.6 Mutationen im MyoD-Molekül geben Hinweise auf den Mechanismus der MyoD vermittelten Aktivierung des p75^{NGFR}-4kb-CAT

Mit verschiedenen MyoD-Mutanten wurde untersucht, welche Bereiche des MyoD-Proteins für eine Aktivierung des p75^{NGFR}-4kb-CAT vorhanden sein müssen. Interessanterweise konnte kein Unterschied der einzelnen Mutanten in ihrer Aktivierung des MCK-4R-CAT und des p75^{NGFR}-4kb-CAT mit den in der Literatur beschriebenen Aktivitäten beobachtet werden, mit der Ausnahme von Δ N-MyoD. Für alle anderen MyoD-Mutanten ist aber folgendes festzustellen:

1. Eine Deletion der Aminosäuren 63-99 hatte keinen Einfluß auf die Aktivierung des p75^{NGFR}-4kb-CAT. Beim MCK-4R-CAT konnte jedoch eine ca. 15%ige Reduktion der CAT-Aktivität beobachtet werden. In der Literatur ist diese Mutante ebenfalls als voll funktionsfähig beschrieben worden und soll sogar eine verstärkte Aktivität im Vergleich zum Wild-Typ-MyoD haben (Weintraub et al. 1991; Davis et al. 1990).
2. Die Deletion der Aminosäuren 102-135 und 143-162 zeigten, daß diese Regionen, wie für die Myogenese beschrieben wurde, für eine MyoD vermittelte Aktivierung der CAT-Konstrukte essentiell sind. Diese Mutanten zeigen, daß für die p75^{NGFR}-Aktivierung eine DNA-Bindung über die basische Region des MyoD-Moleküls genauso erforderlich ist, wie die Möglichkeit, mit anderen Proteinen über die HLH-Domäne zu kooperieren (Weintraub et al. 1991).
3. Die Substitution der Aminosäure T 115 zu N 115 zeigte eine leicht verringerte Aktivität, entspricht aber auch den Angaben in der Literatur, wo gezeigt wurde, daß

- diese Mutante die DNA bindet und die Myogenese *in vivo* aktiviert (Bengal et al. 1994).
4. Die Substitutionsmutanten A114→N und A114→D, sowie 114→T können in Verbindung mit E12 die DNA in der E-Box zwar binden, jedoch nicht transaktivieren. Diese Mutanten gelten daher als positive Kontrollmutanten.
 5. Von der A114→T ist sogar beschrieben, daß sie als dominant negativer Inhibitor eingesetzt werden kann (Davis und Weintraub 1992). Alle drei Mutanten zeigten keine Aktivierung des p75^{NGFR}-4kb-CAT.
 6. Als gesondert zu betrachten ist die ΔN-MyoD-Mutante, bei der die Aminosäuren 3 - 56 des Aminoterminales deletiert wurden. Dieser Bereich enthält eine starke Transaktivatordomäne, welche außerdem, im Gegensatz zum Carboxyterminalenende, essentiell für die kooperative Bindung zweier E-Box-Motive durch MyoD ist. Die Bindung einer einzelnen E-Box durch MyoD führt zu keiner Transaktivierung, so daß gezeigt werden konnte, daß ΔN-MyoD den MCK-4R-CAT nur sehr schwach aktivieren kann. Es konnte jedoch beobachtet werden, daß ein 3,3kb großes MCK-Promotorfragment bzw. die Myogenese durch ΔN-MyoD aktiviert werden kann.

Weintraub et al. (1990) postulierten, daß stabilisierende Proteine (z.B. MEF-2) mit einer eigenen Transaktivatordomäne bzw. DNA-Bindungsstelle im MCK-Promotor mit MyoD kooperieren und somit die Aktivierung einleiten. Übertragen auf die MyoD-Aktivierung des p75^{NGFR}-4kb-CAT ist aufgrund der nicht vorhandenen Aktivierung des p75^{NGFR}-4kb-CAT durch ΔN-MyoD zu vermuten, daß es hier zu keiner Assoziation von stabilisierenden Proteinen kommt. In Bezugnahme zu den anderen Daten, ist jedoch ein solches Protein zu fordern, welches zwar die Kooperation von MyoD zu einer anderen DNA-Bindungsstelle unterstützt, aber nicht selber transaktivieren kann. Zusammenfassend konnte mit den MyoD-Mutanten gezeigt werden, daß die N-terminale Transaktivatordomäne des MyoD-Moleküls eine wichtige Rolle bei der Transaktivierung des p75^{NGFR}-4kb-CAT spielt. Hier könnte auch eine Ursache zu suchen sein, weshalb das Wild-Typ-Myf5-Molekül im Gegensatz zu dem in seiner

Transaktivatordomäne veränderten Myf5-VP16 Molekül den p75^{NGFR}-4kb-CAT nicht aktivieren kann.

Die Bindung von MyoD an die DNA über die basische Domäne ist genauso essentiell wie die Kooperation mit weiteren Proteinen über die HLH-Domäne.

Wie mit den positiven Kontrollmutanten gezeigt werden konnte, handelt es sich bei der MyoD vermittelten Aktivierung des p75^{NGFR}-4kb-CAT um einen direkten MyoD-Effekt, bei dem es auf ein vollständiges intaktes Molekül ankommt und die aktivierende Wirkung nicht an einzelnen Domänen fest gemacht werden kann.

5.7 Proteine, die die MyoD-Aktivierung des p75^{NGFR}-4kb-CAT regulieren, geben weitere Informationen über die Funktionsweise des Transkriptionsfaktors

In jüngster Zeit gibt es immer mehr Hinweise dafür, daß die regulative Wirkung der myogenen Transkriptionsfaktoren auf der Kooperation von verschiedenen Molekülen in Transkriptionskomplexen beruht (Eckner et al. 1996; Gu et al. 1993; Croissant et al. 1996). Die MEF-Faktoren sind solche Proteine, die in enger Kooperation mit den myogenen bHLH-Proteinen für eine Zunahme der myogenen Konversion von Fibroblasten bei einer Cotransfektion sorgen (Molkentin et al. 1995).

Die MEF-2-Transkriptionsfaktoren wurden zuerst als DNA bindende Proteine identifiziert, die ein A/T-reiches Element im MCK-enhancer erkennen (Gossett et al. 1989). Mittlerweile werden vier MEF-2-Proteine unterschieden, die sich ihrerseits wieder in viele verschiedene Splicevarianten unterteilen lassen. Im Gegensatz zu MEF-2B, welches keine DNA-Bindung aufweist, binden MEF-2A, MEF-2C und MEF-2D die gleiche DNA-Sequenz. Es konnte aber beobachtet werden, daß diese von den MEF-Faktoren mit einer unterschiedlichen Affinität gebunden wird, was vermuten läßt, daß die unter den vier MEF-2-Faktoren nicht konservierten Aminosäuren ihr Bindungsverhalten beeinflusst. Eine Möglichkeit, wie die Aktivität der MEF-2-Faktoren reguliert sein könnte ist, daß die MEF-2-Bindungsstelle auch von anderen Transkriptionsfaktoren, wie z.B. HF-1b (Zhu et al. 1993) oder der herzspezifische Faktor BBF-1 (Zhou et al. 1993) gebunden werden können und somit gegenseitig um die MEF-Bindungsstelle konkurrieren (Olson et al. 1995).

Während der *in- vitro* Muskeldifferenzierung von Skelettmyoblasten akkumulieren die MEF-2 Proteine zeitlich versetzt. Als erstes wird MEF-2D in Myoblasten exprimiert. Es scheint aber die muskelspezifischen Zielgene erst mit dem Verlassen des Zellzyklusses zu aktivieren (Breitbart et al. 1993). Welche Mechanismen zu dieser Repression der MEF-2D-Aktivität in Myoblasten führen, bleibt zu untersuchen (Olson et al. 1995).

Nach der Initiierung der Differenzierung, z.B. nach der Wegnahme von Serum im Medium, akkumuliert MEF-2A in den Zellen, ist aber auch schon in geringen Mengen in Myoblasten nachweisbar. MEF-C wird erst in Myotuben exprimiert (Breitbart et al. 1993; Martin et al. 1993; McDermon et al. 1993).

Im Gegensatz zu der beschriebenen Verstärkung von Genen, die in die terminale Differenzierung involviert sind, zeigt die Cotransfektion von MyoD und MEF-2A einen inhibierenden Effekt auf die MyoD vermittelte p75^{NGFR}-4kb-CAT-Aktivierung. MEF-2D, von dem gezeigt wurde, daß es in sich teilenden Myoblasten offensichtlich inaktiv ist, unterscheidet sich in diesem Experiment von MEF-2A, in dem es die MyoD-Aktivierung des p75^{NGFR}-4kb-CAT nicht inhibiert. Dies wirft ein ganz neues Licht auf die Funktionsweise der Kooperation von myogenen bHLH-Transkriptionsfaktoren und MEF-2-Proteinen während der Muskeldifferenzierung. Es zeigt sich hier, daß die MEF-Faktoren nicht nur eine die Differenzierung verstärkende Funktion haben, sondern auch eine selektive Wirkung ausüben. Diese selektive Wirkung der MEF-Faktoren auf MyoD scheint die Aktivierung von Prädiffenzierungsgenen, wie den p75^{NGFR}, zu Gunsten der Aktivierung von Genen der terminalen Differenzierung umzukehren. Der zeitliche Verlauf der MEF-2A- und p75^{NGFR}-Expression, während dessen der p75^{NGFR} abnimmt und MEF-2A sich akkumuliert, geben einen Hinweis darauf. Wie bereits erwähnt wurde, könnte es sich hierbei um benachbarte MEF- bzw. MyoD-Bindungsstellen handeln, die sich negativ beeinflussen, oder aber um Proteine, die in proliferierenden Zellen an MyoD assoziiert sind und mit der Zunahme von MEF-2A verdrängt werden.

Für die Regulation des $p75^{\text{NGFR}}$ in C2C12-Muskelzellen ergibt sich, unter der Berücksichtigung der in dieser Arbeit erbrachten Ergebnisse, folgendes Bild.

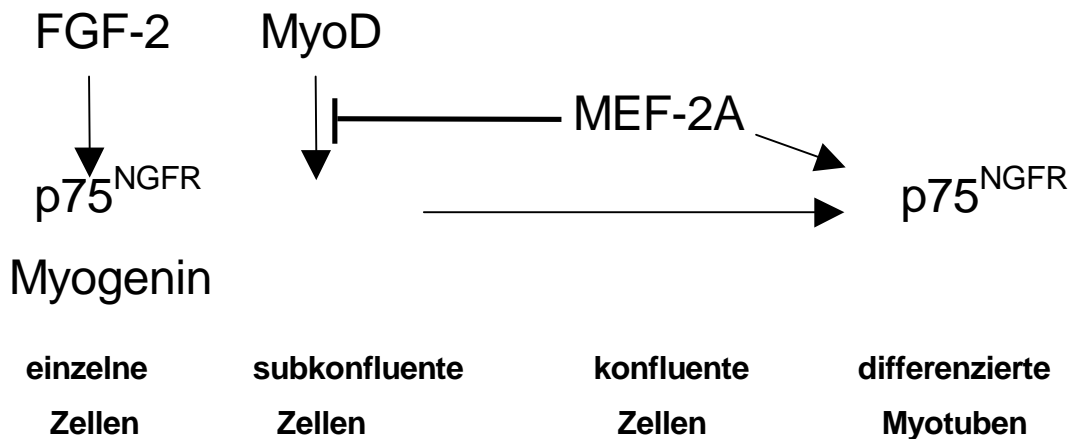


Abb. 37 : Überlegung der Regulation und Funktion des $p75^{\text{NGFR}}$ während der Differenzierung der Mausmuskelzelllinie C2C12.

Während die Zellen in der Zellkulturschale verhältnismäßig einzeln liegen, könnte die $p75^{\text{NGFR}}$ -Regulation hauptsächlich über eine autokrine FGF-2-Stimulation erfolgen. Mit der Zunahme der Zelldichte könnte MyoD diese Aufgabe immer mehr übernehmen, so daß dann mit dem Konfluentwachsen der Zellen durch die Zunahme von MEF-2A die MyoD vermittelte Aktivierung des $p75^{\text{NGFR}}$ verschoben wird und Gene der terminalen Differenzierung, wie z.B. Myogenin, durch die Kooperation von MyoD und den MEF-2-Faktoren induziert wird.

5.8 Einfluß von E1A auf die $p75^{\text{NGFR}}$ -Regulation

Die Inaktivierung der myogenen bHLH-Transkriptionsfaktoren und die damit verbundene Blockierung der Muskeldifferenzierung durch das adenovirale E1A-Protein, machte den Einsatz dieses Proteins gerade in den letzten Jahren zu einem immer häufiger verwendeten Hilfsmittel zur Untersuchung der molekularen Mechanismen der Myogenese (Mymryk et al. 1992; Braun et al. 1992). Die genaue Wirkweise ist dabei noch nicht endgültig geklärt. Es ist zumindest bekannt, daß das E1A-Protein verschiedene pocket-Proteine, wie pRB und p107, sowie Coaktivatoren wie p300 bindet, welche in die Muskeldifferenzierung involviert sind (Gu et al. 1993; Schneider et al. 1994; Yuan et al. 1996; Eckner et al. 1996).

Wie bereits gezeigt wurde, wird die $p75^{\text{NGFR}}$ -Expression durch E1A in der neuronalen Zelllinie PC12 (Boulukos und Ziff 1993) und, wie in dieser Arbeit nachgewiesen wurde, auch in der Muskelzelllinie L6 unterbunden. Die gleiche inhibierende Wirkung konnte im CAT-Experiment mit der Cotransfektion des $p75^{\text{NGFR}}$ -4kb-CAT mit MyoD und E1A bestätigt werden. Dies zeigt, daß die $p75^{\text{NGFR}}$ -4kb-CAT-Aktivierung sich genauso verhält wie das Gen in der Zelle.

Die in dem Experiment verwendeten E1A-Mutanten, die die Proteine p300 oder pRb bzw. beide nicht mehr binden können (Wang et al. 1993), bestätigen die Ergebnisse von Sandmöller et al. (1996).

Wie am Beispiel des Myosin light chain enhancers gezeigt werden konnte, inhibiert die E1A-Doppelmutante, welche weder pRb noch p300 binden kann, die MyoD vermittelte Aktivierung des $p75^{\text{NGFR}}$ -4kb-CAT ebenso.

Daß diese Inhibition nicht obligatorisch ist, zeigt die Aktivierung des MCK-4R-CAT durch MyoD und bestätigt die Annahme, daß die Inhibition durch E1A nicht auf einer unterbliebenen DNA-Bindung beruht (Braun et al. 1992), sondern in der Unterbindung eine Kooperation zwischen dem Transkriptionsfaktor und weiteren Molekülen zu suchen ist. Des weiteren ergibt sich aus dem Experiment, daß die Aktivierung des $p75^{\text{NGFR}}$ -4kb-CAT durch MyoD kein kumulativer Effekt von mehreren kooperierenden MyoD-Bindungsregionen ist, sondern es sich, wie bei den anderen von der E1A Doppelmutante inhibierten Promotoren, um eine einzelne E-Box handelt. Bei einem kumulativen Effekt wäre es, wie beim E-Box-Tetramer des MCK-4R-CAT, zu keiner Inhibition durch die E1A-Doppelmutante gekommen. Die verschiedenen E1A-Mutanten konnten außerdem zeigen, daß für eine reine E-Box vermittelte Aktivierung eines Promotors die Proteine p300 und pRb essentiell sind.

Wie bereits gezeigt wurde, führt ein Ersetzen der Transaktivatordomäne des Myf5-Moleküls gegen die Transaktivatordomäne des HSV-VP16-Virusproteins einerseits zur Aufhebung der E1A vermittelten Inhibition der Myf5-Aktivierung des MCK-4R-CAT (Braun et al. 1992), und andererseits zur Myf5 vermittelten Aktivierung des $p75^{\text{NGFR}}$ -4kb-CAT, was das Myf5-Wild-Typ-Molekül nicht vermochte. Dieses Ergebnis legt die Vermutung nahe, daß der Myf5-Wild-Typ zwar eine in dem $p75^{\text{NGFR}}$ -4kb-CAT vorhandene Bindungssequenz erkennt, jedoch nicht transaktivieren kann. Wie bereits anhand der N-terminal deletierten MyoD-Mutante demonstriert wurde, ist für die

p75^{NGFR}-4kb-CAT-Aktivierung eine intakte Transaktivator-domäne ausschlaggebend. Da die myogenen Transkriptionsfaktoren in ihrer bHLH-Domäne hoch konserviert sind, sich jedoch in ihren Transaktivator-domänen teilweise unterscheiden, wäre es daher möglich, daß ein geringfügiger Unterschied in diesen Domänen für die beobachtete unterschiedliche Transaktivierung verantwortlich ist. Infrage kommen könnten hierfür kooperierende Proteine, die für ihre weitere Funktion spezifisch von der MyoD-Transaktivator-domäne abhängig sind. Ein ähnliches unterschiedliches Verhalten der beiden Transkriptionsfaktoren wurde schon bei der Nichtaktivierung des Myogenin-Gens in NiH3T3-Zellen durch Myf5 beschrieben (Ragge 1996), was die Vermutung unterstützt, daß Myf5 und MyoD zwar die gleichen Bindungssequenzen auf Promotoren haben, jedoch ein unterschiedliches Set von kooperierenden Proteinen assoziieren.

Somit bleibt abschließend festzustellen, daß der p75^{NGFR} nicht nur in neuronale, sondern auch in myogene Differenzierungsprozesse involviert ist.

Anhang

6 Anhang

6.1 Abkürzungen

AMV-RT	Avian-Myeloblastosis-Virus-Reverse-Transcriptase
ATCC	American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA
bHLH	basic Helix-loop-Helix
bp	Basen paare
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserum-Albumin)
CAT	Chloramphenico-Acety-Transferase
cDNA	copy Desoxyribonukleinsäure
DM	Differenzierungsmedium
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
ER	Östradiol-Rezeptor
FCS	Fetal Calve Serum (Fötales Kälberserum)
FGF-2	Fibroblasten Wachstumsfaktor 2
GM	Growth Medium (Wachstumsmedium)
h	Stunde
HS	Horse Serum (Pferdeserum)
HSV	Herpes-Simplex-Virus
Id	Inhibitor of differentiation
LH	Laktalbuminhydrolysat
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilo Dalton
MCK	Muskel-Kreatinkinase
MEF	Myocyte-enhancer-faktor (Myozyten-Verstärkungs-F.)
MHC	Myosin-Heavy-Chain (Myosin-Schwere-Kette)
MLC	Myosin-Light-Chain (Myosin-Leichte-Kette)
MRF	Myogenese regulierender Faktor
Myf	Myogener Faktor
MyoD	Myogener Determinator

neo	Neomycin
NGF	Nerve-Growth-Factor (Nerven Wachstumsfaktor)
p75 ^{NGFR}	75kDa großer NGF Rezeptor
PCR	Polymerase-chain-reaktion (Polymerase-Ketteneaktion)
RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
Taq	Thermus aquaticus
TK	Thymidinkinase
Trk	Tyrosinkinase
VP16	HSV-Protein 16

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Restriktionskarte der p75 ^{NGFR} -cDNA (Radek et al. 1987).	33
Abb. 2 : Nachweis des p75 ^{NGFR} auf parentalen C2C12-Zellen (A) und auf pEMSV-p75 ^{NGFR} stabiltransfizierten C2C12-Zellen (B).	35
Abb. 3: Nachweis der konstitutiven p75 ^{NGFR} -Expression in den stabil-transfizierten C2C12-Zellen während der Kultivierung unter Differenzierungsbedingungen.	35
Abb. 4: Detektion des C2C12-p75 ^{NGFR} -Anti-Sinn-Klons.	36
Abb. 5: p75 ^{NGFR} -Überexpressionsklon nach Immunfluoreszenzmarkierung.	38
Abb. 6: Bestimmung des Zellwachstums der vier unterschiedlichen C2C12-Klone.	40
Abb. 7: Prozentualer Anteil der Desmin-positiven Zellen an der Gesamtzellzahl	41
Abb. 8: Immunhistochemische Anfärbung des MHC.	43
Abb. 9: Prozentualer Anteil der MHC-positiven Zellen an der Gesamtzellzahl.	43
Abb. 10: Expressionsverlauf einiger ausgewählter Gene während der Kultivierung der vier Zellklone	45
Abb. 11: Feststellung der NGF-Expression in verschiedenen Zelllinien.	48
Abb. 12: Zymographie verschiedener Zelllinien. Vergleich zwischen NGF behandelten und nicht behandelten Zellen.	50
Abb. 13: Zymographie von L6-Zellen mit zunehmender Kultivierungsdauer und NGF-Zugabe	50
Abb. 14: Untersuchung auf eine Transin1 Expression in verschiedenen Zelllinien	51
Abb. 15: Untersuchungen zur Expression des FGFR1 und FGF-2 in C2C12- und L6-Zellen	55
Abb. 16: Northern-Analyse der Abhängigkeit der p75 ^{NGFR} -Expression von der kultivierten Zelldichte (A) und der Zugabe von 10ng/ml FGF-2 (B) in der C2C12-Zelllinie.	56
Abb. 17: Northern-Analyse der Abhängigkeit der p75 ^{NGFR} -Expression von der kultivierten Zelldichte in der L6-Zelllinie.	57
Abb. 18: Northern-Analyse über den Einfluß von FGF-2 auf die p75 ^{NGFR} -Expression im Vergleich zwischen L6- und C2C12-Zellen.	57
Abb. 19: RT-PCR zur Untersuchung der Myogenin-Expression der C2C12-Zellen von Abb. 21 bzw. Abb. 22.	58

Abb. 20 : Northernblot zum Nachweis der p75 ^{NGFR} -Expression in L6- und L6-E1A-Zellen	60
Abb. 21: Zelldichteabhängige p75 ^{NGFR} und Id-Expression in L6-Myoblasten.	63
Abb. 22: CAT-Test, in dem der Einfluß der vier myogenen bHLH-Transkriptionsfaktoren auf den p75 ^{NGFR} -4kb-CAT untersucht wurde.	65
Abb. 23: Konzentrationsabhängige Aktivierung des p75 ^{NGFR} -4kb-CAT durch MyoD.	67
Abb. 24: CAT-Test zur Aktivierung des p75 ^{NGFR} -4kb-CAT mittels der β -Östradiol induzierbaren Hybridmoleküle MyoD-ER und Myf5-ER	67
Abb. 25: Aktivierung des p75 ^{NGFR} -4kb-CAT durch MyoD-VP16 und Myf5-VP16.	69
Abb. 26: Vergleich zwischen der MyoD vermittelten Aktivierung des p75 ^{NGFR} -4kb-CAT und des 15/500 Myogenin-CATs in proliferierenden (nach 24h) und ruhenden Zellen (nach 72h).	72
Abb. 27: Vergleich zwischen einem 0,4kb und 4kb p75 ^{NGFR} -Promotorfragment auf MyoD-Aktivierbarkeit.	74
Abb. 28: Untersuchung unterschiedlich großer p75 ^{NGFR} -CAT-Reportergene auf ihre MyoD-Aktivierbarkeit.	75
Abb. 29: CAT-Test zur Untersuchung des Einflusses von E12 auf den p75 ^{NGFR} -4kb-CAT.	77
Abb. 30: Vergleich zwischen der Aktivierbarkeit des p75 ^{NGFR} -4kb-CAT und des MCK-4R-CAT durch verschiedene MyoD-Mutanten.	80
Abb. 31: CAT-Test über den Einfluß von MEF-2A auf die MyoD vermittelte Aktivierung des p75 ^{NGFR} -4kb-CAT.	84
Abb. 32: Vergleich zwischen MEF-2A und MEF-2D	85
Abb. 33: Vergleich der Aktivierung des p75 ^{NGFR} -4kb-CAT zwischen einer MEF-2A stabil überexprimierenden C3H10T1/2-Zelllinie und der parental C3H10T1/2-Zelllinie nach der Transfektion zweier unterschiedlicher MyoD-Konzentrationen.	86
Abb. 34: Inhibierende Wirkung von verschiedenen E1A-Mutanten auf die MyoD vermittelte Aktivierung des p75 ^{NGFR} -4kb-CAT und des MCK-4R-CAT.	89

-
- Abb. 35: Unterschiedlich inhibierende Wirkung des E1A-Proteins auf die Myf5-VP16 (Myf5VP) und MyoD-VP16 (MyoDVP) vermittelte Aktivierung des MCK-4R-CAT und des 15/500 Myogenin-CAT bzw. p75^{NGFR}-4kb-CAT. 91**
- Abb. 36: Gegenteiliger Effekt bei C2C12-Zellen nach NGF-Zugabe (Seidl). 98**
- Abb. 37 : Überlegung der Regulation und Funktion des p75^{NGFR} während der Differenzierung der Mausmuskelzelllinie C2C12. 110**

7 Literatur

Anton, E.S., Weskamp, G., Reichardt, L.F., and Matthew, W.D. (1994).

Proc. Natl. Acad. Sci., 91, 2795-2799.

Bayley, S.T. and Mymryk, J.S. (1994). Adenovirus E1A proteins and transformation. J. Onkology, 5, 425-444.

Bengal, E., Flores, O., Rangarajan, P., Chen, A., Weintraub, H., and Verma, I. (1994). Positive control mutations in the MyoD basic region fail to show cooperative DNA binding and transcriptional activation *in vitro*.

Proc. Natl. Acad. Sci., 91, 6221-6225.

Benedetti, M., Levi, A., and Chao, M.V. (1993). Proc. Natl. Acad. Sci. 90, 7859-7863.

Benezra, R., Davis, R.L., Lockshon, D., Turner, D.L., and Weintraub, H. (1990). The Protein Id: A Negative Regulator of Helix-Loop-Helix DNA Binding Proteins. Cell, 62, 49-59.

Bober, E., Lyons, G.E., Braun, T., Cossu, G., Buckingham, M. and Arnold, H.H. (1991). The muscle regulatory gene, Myf-6, has a biphasic pattern of expression during early mouse development. J. Cell Biol., 113, 1255-65

Bothwell, M. (1991). Current Topics in Microbiology and Immunology. Springer-Verlag.

Boulukos, K.E., Ziff, E. (1993). Adenovirus 5 E1A proteins disrupt the neuronal phenotype and growth factor responsiveness of PC12 cells by a conserved region 1-dependent mechanism. Oncogene, 8, 237-248.

Braun, T., Winter, B., Bober, E., and Arnold, H.H. (1990). Transcriptional activation domain of the muscle-specific gene-regulatory protein myf5. *Nature*, 346, 663-65.

Braun, T. and Arnold, H.H. (1991). The four human muscle regulatory helix-loop-helix proteins Myf3-Myf6 exhibit similar hetero-dimerization and DNA binding properties. *Nucleic Acids Res.*, 19, 5645-5651.

Braun, T., Bober, E., and Arnold, H.H. (1992). Inhibition of muscle differentiation by the adenovirus E1a protein: repression of the transkriptional activation function of the bHLH protein Myf5. *Genes&Dev.*, 6, 888-902.

Braun, T., and Arnold, H.H. (1996). Myf5 and myoD genes are activated in distinct mesenchymal stem cells and determine different skeletal muscle cell lineages. *EMBO J.* 15, 310-318.

Breitbart, R.E., Liang, C., Smoot, L.S., Laheru, D., Mahdavi, V., and Nadal-Ginard, B. (1993). A fourth human MEF2 transcription factor, hMEF2D, is an early marker of myogenic lineage. *Development*, 118, 1095-1106.

Buchberger, A., Ragge, K. and Arnold, H.H. (1994). The Myogenin gene is activated during myocyte differentiation by pre-existing, not newly synthesized transkription transcription factor MEF-2. *J. Biol. Chem.*, 269, 17289-96.

Bullock, W. O., Fernandez, J. M. and Short, J. M. (1987). A high efficiency plasmid transforming recA Escherichia coli strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques*, 5, 376.

Byers, M.R., Schatterman, G.C., and Bothwell, M. (1990). Multiple functions for NGFR receptor in developing, aging and injured rat teeth are suggested by epithelial, mesenchymal and neuronal immunoreactivity. *Development*, 109, 461-471.

Chao, M.V., Bothwell, M.A., Ross, A.H., Koprowski, H., Lanahan, A.A., Buck, C.R., Sehgal, A. (1986). Gene transfer and molekular cloning of the human NGF receptor. *Science*, 232, 518-521.

Casaccia-Bonnet, P., Carter, B.D., Dobrowsky, R.T., and Chao, M.V. (1996). Death of oligodendrocytes mediated by the interaction of nerve growth factor with its receptor p75. *Nature*. 383, 716

Carter, B.D., Kaltschmidt, C., Kaltschmidt, B., Offenhauser, N., Bohm-Matthaei, R., Baeuerle, P.A., and Barde, Y.A. (1996). Selective activation of NF κ B by nerve growth factor through the neurotrophin receptor p75. *Science*, 272, 542-545.

Chen, L.(1977). Alteration in cell surface LETS Protein during myogenesis. *Cell*, 10, 393-400.

Chiaramello, A., Neuman, K., Palm, K., Metsis, M., and Neuman, T. (1995). Helix-Loop-Helix Transcription Factors Mediate Activation and Repression of the p75^{NGFR} Gene. *Mol. Cell. Biol.*, 15, 6036-6044.

Cohen, S. and Levi-Montalcini, R. (1956). A nerve growth-stimulating factor isolated from snake venom. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 42, 571-574.

Croissant, J.D., Kim, J.-H., Eichele, G., Goering, L., Lough, J., Prywes, R., and Schwartz, R.J. (1996). Avian Serum Response Factor Expression Restricted Primarily to Muscle Cell Lineages Is Required for α -Actin Gene Transcription. *Dev. Biol.*, 177, 250-264.

Czihak, G., Langer, H., Ziegler, H. (1984). *Biologie (Ein Lehrbuch)*. Springer Verlag.

Davis, R. L., Weintraub, H. and Lassar, A. B. (1987). Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell*, 51, 987-1000.

Davis, R.L., Cheng, P.F., Lassar, A.B., and Weintraub, H. (1990). The MyoD DNA Binding Domain Contains a Recognition Code for Muscle-Specific Gene Activation. *Cell*, 60, 733-746.

Davis, R. L. and Weintraub, H. (1992). Acquisition of Myogenic Specificity by Replacement of Three Amino Acid Residues from MyoD into E12. *Science*, 256, 1027-1030.

Davies, A.M., Wyatt, S., Nishimura, M., and Phillips, H. (1995). NGF Receptor Expression in Sensory Neurons Develops Normally in Embryos Lacking NGF. *Dev. Biol.*, 171, 434-438.

Dickson, G., Peck, D., Moore, S.E., Barton, C.H., and Walsh, F. (1992). Enhanced myogenesis in NCAM-transfected mouse myoblasts. *Nature*, 344, 348-351.

Durbeej, M., Söderström, S., Ebendal, T., Birchmeier, C., and Ekblom, P. (1993). Differential expression of neurotrophin receptors during renal development. *Development*, 119, 977-989.

Eckner, R., Yao, T.-P., Oldread, E., and Livingston, D.M. (1996). Interaction and Functional Collaboration of p300/CBP and bHLH Proteins in Muscle and B-cell Differentiation. *Genes & Dev.*

Enkemann, S.A., Konieczny, S.F., and Taparowsky, E.J., (1990). Adenovirus 5 E1a represses muscle-specific enhancers and inhibits expression of the myogenic regulatory factors genes, MyoD1 and myogenin. *Cell. Growth Differ.*, 1, 375-382.

Ernfors, P., Wetmore, C., Eriksdotter-Nilsson, M., Bygdeman, M., Stromberg, I., Olson, L., and Persson, H. (1991). The nerve growth factor receptor gene is expressed in both neuronal and non-neuronal tissues in the human fetus. *Int. J. Dev. Neurosci.*, 9, 57-66

Frade, J.M., Rodríguez-Tébar, A., and Barde, Y.A. (1996). Induction of cell death by endogenous nerve growth factor through its p75 receptor. *Nature*, 383, 166-168.

Floß, T. (1997). Dissertation der TU-Braunschweig.

Goldstein, R.S., Aviivi, C., and Geffen, R. (1997). In vivo NGF treatment increases proliferation in the primary sympathetic ganglia of chick Embryos. *Dev. Biol.*, 181, 116-120.

Green, P.J., Walsh, F.S. and Doherty, P. (1996). Promiscuity of fibroblast growth factor receptors. *BioEssays*, Vol. 18, 639-646.

Greene, L.A., Kaplan, D.R. (1995). Early events in neurotrophin signalling via Trk and p75 receptors. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 5, 579-587.

Gu, W., Schneider, J.W., Condorelli, G., Kaushal, S., Mahdavi, V., and Nadal-Ginard, B. (1993). Interaction of myogenic factors and the retinoblastoma Protein mediates muscle cell commitment and differentiation. *Cell*, 72, 309-323.

Hamburger, V. (1934). *J. Exp. Zool.* 449.

Hannun, Y.A. (1994). The Sphingomyelin Cycle and the second messenger function of Ceramide. *J. Bio. Chem.*, 269, 3125-3128.

Harlow, E., Whyte, P., Franza, B.R. and Schley, C. (1986). Association of adenovirus early-region 1A proteins with cellular polypeptides. *Mol. Cell. Biol.*, 6, 1579-1589.

Hantzopoulos, P.A., Suri, P.A., Glass, D.J., Goldfarb, M.P., and Yancopoulos. (1994). The low affinity receptor, p75, collaborate with each of the Trks to potentiate functional response to the neurotrophins. *Neuron*, 13, 187-201.

Hemstead, B.L., Martin-Zanca, D., Kaplan, D.R., Parada, L.F., and Chao, M.V. (1991). High-affinity NGF binding requires coexpression of the trk proto-oncogen and the low-affinity NGF receptor. *Nature*, 360, 678-683.

Heuer, J. G., Fatemie-Nainie, S., Wheeler, E.F., and Bothwell, M. (1990). Structure and developmental expression of the chicken NGF receptor. *Dev. Biol.*, 137, 287-304.

Herrmann, J.L., Menter, D.G., Hamada, J., Marchetti, D., Nakajima, M., and Nicolson G.L. (1993). *Mol. Biol. Cell*, 4, 1205-1216.

Hollenberg, S.M., Ceng, P.F., and Weintraub, H. (1993). Use of a conditional MyoD transcription factor in studies of MyoD trans-activation and muscle determination. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90, 8028-8032.

Huber, L.J. and Chao, M.V. (1995). Mesenchymal and neuronal cell expression of the p75 neurotrophin receptor gene occur by different mechanisms. *Dev. Biol.*, 167, 227-238.

Itoh, K., Brackenbury, R., and Akeson, R.A. (1995). Induction of L1 mRNA in PC12 cells by NGF is modulated by cell-cell contact and does not require the high-affinity NGF receptor. *J. Neurosci.*, 15, 2504-2512.

Itoh, N., Mima, T., and Mikawa, T. (1996). Loss of fibroblast growth factor receptors is necessary for terminal differentiation of embryonic limb muscle. *Development*, 122, 291-300.

Jainchill, J.L., Aaronson, S.A., and Todaro, G.J. (1969). Murine sarcoma and leukemia viruses: assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells. *J. Virol.*, 4, 549-553.

Johnsn, E.M. et al. (1987) *J. Neurosci.*, 7, 923-929.

Kaushal, S., Schneider, J.W., Nadal-Ginard, B., Mahdavi, V. (1994), *Science*, 266, 1236-1240.

Kaplan, D.R. and Miller, F.D. (1997). Signal transduction by the neurotrophin receptors. *Current Opinion in Cell Biology*, 9, 213-221.

Kong, Y., Johnson, S.E., Taparowsky, E.J., and Konieczny, S.F. (1995). Ras p21^{Val} Inhibits Myogenesis without Altering the DNA Binding or Transcriptional Activities of the Myogenic Basic Helix-Loop-Helix Factors. *MCB*, 15, 5205-5213.

Lassar, A.B., Davis, R.L., Wright, W.E., Kadesch, T., Murre, C., Voronova, A., Baltimore, D., and Weintraub, H. (1991). Functional Activity of Myogenic HLH Proteins Requires Hetero-Oligomerization with E12/E47-like Proteins *In vivo*. *Cell*, 66, 305-315.

Lee, K.L., Li, E., Huber, J., Landis, S.C., Sharpe, A.H., Chao, M.V., and Jaenisch, R. (1992). Targeted Mutation of the Gene Encoding the Low Affinity NGF Receptor p75 Leads to Deficits in the Peripheral Sensory Nervous System. *Cell*, 69, 737-749.

Lee, K.F., Bachman, K., Landis, S., Jaenisch, R. (1994a). Dependence on p75 for Innervation of Some Sympathetic Targets. *Science*, 263, 1447-1449.

Lee, K.F., Davies, A.M., Jaenisch, R. (1994b). p75-deficient embryonic dorsal root sensory and neonatal sympathetic neurons display a decreased sensitivity to NGF. *Development*, 120, 1027-1033.

Leibovitch, M.P., Leibovitch, S.A., Hillion, J., Guillier, M., Schmitz, A., and Harel, J. (1987). Possible Role of c-fos, c-N-ras and c-mos Proto-oncogenes in Muscular Development. *Exp. Cell res.*, 170, 80-92.

Li, L., Zhou, J., James, G., Heller-Harrison, R., Czech, M.P., and Olson, E. (1992). FGF inactivates myogenic Helix-Loop-Helix Proteins through phosphorylation of a conserved Protein kinase C site in their DNA-binding domains. *Cell*, 71,1181-1194.

Loetscher, H., Pan, Y.-C.E., Lahm, H.-W., Gentz, R., Brockhaus, M., Tabuchi, H., Lesslauer, W. (1990). Molecular cloning and expression of the human 55kd tumor necrosis factor receptor. *Cell*, 61, 352-359.

Mahadeo, D. et al. (1994). *J. Bioll. Chem.*,269,6884-6891.

Martin, J.F., Schwarz, J.J., and Olson, E. (1993). Myocyte enhancer factor (MEF) 2C: A tissue-restricted member of the MEF-2 family of transkription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90, 5282-5286.

Mason, I. (1994). Do adhesion molecules signal via FGF receptors? *Current Biology*, 4, 1158-1161.

Mathieu, C., Duprat, A.-M., Zalta, J.-P., Beetschen, J.C. (1971). Action du facteur de croissance nerveuse (Nerve Growth Factor) sur la differenciation de cellules embryonnaaires d'amphibien. *Exp. Cell Res.*, 68,25-32.

McDonnell, S.E., Kerr, L.D., and Matrisian, L.M. (1990). Epidermal Growth Factor Stimulation of Stromelysin mRNA in Rat Fibroblasts Requires Induction of Proto-Oncogenes c-fos and c-jun and Activation of Proteinkinase C. *Mol. Cell. Biol.*, 10, 4284-4293.

Metsis, M., Timmusk, T., Allikmets, R., Saarma, M., and Persson, H. (1992). Regulatory elements and transcriptinal regulation by testosterone and retinoic acid of the rat nerve growth factor receptor promoter. *Gene*, 121, 247-254.

Molkentin, J.D., Black, B.L., Marti, J.F., and Olson, E.N. (1995). Cooperative Activation of Muscle Gene Expression by MEF2 and Myogenic bHLH Proteins. *Cell*, 83, 1125-1136.

Moore, J.W., Dionne, C., Jaye, M., and Swain, J.L., (1991). The mRNAs encoding acidic FGF, basic FGF and FGF Receptor are coordinately downregulated during myogenic differentiation. *Development*, 111, 741-748.

Mymryk, J.S., Lee, R.W.H., and Bayley, S.T. (1992). Ability of Adenovirus 5 E1A Protein to Suppress Differentiation of BC3H1 Myoblasts Correlates with Their Binding to a 300 kDa Cellular Protein. *Mol. Biol. Cell*, 3, 1107-1115.

Olivera, A., Buckley, N.E., and Spiegel, S. (1992). *J.Biol. Chem.*, 267, 26121-26127

Olson, E.N., Perry, M., and Schulz, R.A. (1995). Regulation of Muscle Differentiation by the MEF2 Family of MADS Box Transkription Factors. *Dev. Biol.*, 172, 2-14.

Olson, E.N. and Klein, W.H. (1994). bHLH factors in muscle development: dead lines and commitments, what to leave in and to leave out. *Genes & Dev.*, 8, 1-8.

Ott, M.O., Bober, E., Lyons, G., Arnold, H. and Buckingham, M.(1991). Early expression of the myogenic regulatory gene, myf-5, in precursor cells of skeletal muscle in the mouse embryo. *Development*, 111, 1097-1107.

Patil, N., Lacy, E., and Chao, M.V. (1990). Specific neuronal expression of human NGF receptor in the basal forbrain of transgenic mice. *Neuron*, 2, 437-447.

Pizette, G., Chaplain, M.A.J., McElwain,D.L.S., and Byrne, H.M. (1996). Oon the role of angiogenesis in wound healing. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 263, 1487-1493.

Ragge, K. (1996). Molekulare Regulationsmechanismen während der frühen Differenzierungsprozesse von Skelettmuskelzellen. Dissertation, TU-Braunschweig.

Radeke, M.J., Misko, T.P., Hsu, C., Herzenberg, L.A., Shooter, E.S. (1987). Gene transfer and molecular cloning of the rat nerve growth factor receptor. *Nature*, 325, 12 Feb., 593-597.

Rabizadeh, S., Bitler, C.M., Butcher, L.L., and Bredesen, D.E. (1994). *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91, 10703-10706.

Radeva, V. (1978). Effect of the Nerve-Growth Factor (NGF) on certain non neuronal Elements. *Agressologie*, 19, 99-103.

Raivich, G., Zimmermann, A., and Sutter, A. (1985). The spatial pattern of β NGF receptor expression in the developing chick embryo. *EMBO J.*, 4, 637-644.

Reznikoff, C.A., Brankow, D.W., and Heidelberger, C. (1973). Establishment and characterization of a cloned line of C3H mouse embryo cells sensitive to postconfluence inhibition of division. *Cancer Res.*, 33, 3231-3238.

Rodriguez-Tebar, A., Dechant, G., and Barde, Y.-A. (1990). Binding of brain-derived neurotrophic factor to the nerve factor receptor. *Neuron*, 4, 487-492.

Rodriguez-Tebar, A., Dechant, G., Gotz, R., and Barde, Y.-A. (1992). Binding of neurotrophin-3 to its neuronal receptor and interactions with nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor. *EMBO J.*, 11, 917-922.

Ross, A.H., Daou, M.C., McKinnon, C.A., Condon, P.J., Lachyankar, M.B., Stephens, R.M., Kaplan, D.R., and Wolf D., E. (1996). The Neurotrophin Receptor, gp75, Forms a Complex with the Receptor Tyrosin Kinase TrkA. *J. Cell Biology*, 132, 945-953.

Rudnicki, M.A., and Jaenisch, R. (1994). The MyoD family of transcription factors and skeletal myogenesis. *BioEssays*, 17, 203-209.

Sandmöller, A., Meents, H., and Arnold, H.H. (1996). A Novel E1A Domain Mediates Skeletal-Muscle-Specific Enhancer Repression Independently of pRb and p300 Binding. *MCB*, 16, 5846-5856.

Sartorelli, V., Webster, K.A., and Kedes, L. (1990). Muscle-specific expression of the cardiac α -actin gene requires MyoD1, CArG-box binding factor, and Sp1. *Genes & Dev.*, 4, 1811-1822.

Sassoon, D., Lyons, G., Wright, W.E., Lin, V., Lassar, A., Weintraub, H. and Buckingham, M. (1989). Expression of two myogenic regulatory factors Mogenin and MyoD1 during mouse embryogenesis. *Nature*, 341, 303-307.

Schall, T.J., Lewis, M., Koller, K.J., Lee, A., Rice, G.C., Wong, G.H.W., Gatanaga, T., Granger, G.A., Lentz, R., Raab, H., Kohr, W.J., Goddel, V. (1990). Molecular cloning and expression of a receptor for human tumor necrosis factor. *Cell*, 61, 361-370.

Scheibe, R.J., and Wagner, J.A. (1992). Retinoic Acid Regulates Both Expression of the Nerve Growth Factor Receptor and Sensitivity to Nerve Growth Factor. *J. Biol. Chem.*, 267, 17611-17616.

Schneider, J.W., Gu, W., Zhu, L., Mahdavi, V., Nadal-Ginard, B. (1994). Reversal of Terminal Differentiation Mediated by p107 in Rb^{-/-} Muscle Cells. *Science*, 264, 1467-1471.

Seidl, K., and Holstein, A.F. (1990) Organ culture of human seminiferous tubules: A useful tool to study the role of nerve growth factor in the testis. *Cell and Tissue Research*, 261, 539-547.

Seed, J. and Hauschka, S.D. (1988). Clonal Analysis of Vertebrate Myogenesis. *Dev. Biol.*, 128,40-49.

Sehgal, A., Patil, N., and Chao, M. (1988). A Constitutive Promoter Directs Expression of the Nerve Growth Factor Receptor Gene. *Mol.Cell. Biol.*, 8, 3160-3167.

Sherman, L., Stocker, K.M., Morrison, R., and Ciment, G. (1993). Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) acts intracellularly to cause the transdifferentiation of avian neural crest-derived Schwann cell precursors into melanocytes. *Development*, 118, 1313-1326

Smeyne, R.J., Klein, R., Schnapp, A., Long, L.K., Bryant, S., Lewin, A., Lira, S.A., Barbacid, M. (1994). Severe sensory and sympathetic neuropathies in mice carrying a disrupted Trk / NGF receptor gene. *Nature*, 368, 246-249.

Smith, C.J.S., Watson, C.F., Ray, J., Bird, C.R., Morris P.C., Schuch, W., Grierson, D. (1988). Antisense RNA inhibition of polygalacturonase gene expression in transgenic tomatoes. *Nature*, 334, 724-726.

Stamenkovic, I., Clark, E.A., Seed, B. (1989). A B-lymphocyte activation molecule related to the nerve growth factor receptor and induced by cytokines in carcinoma. *EMBO J.*, 8, 1403-1410.

Taylor, S.M., and Jones, P.A. (1982). Changes in phenotypic expression in embryonic and adult cells treated with 5-azacytidine. *J. Cell. Physiol.* 111, 187-194.

Taiji, M., Taiji, K., Deyerle, K.L., and Bothwell, M. (1992). Basic Fibroblast Growth Factor Enhances Nerve Growth Factor Receptor Gene Promoter Activity in Human Neuroblastoma Cell Line CHP100. *Mol. Cell. Biol.*, 12, 2193-2202.

Tapscott, S.J., Davis, R.L., Thayer, M.J., Cheng, P.F., Weintraub, H., Lassar, A.B. (1988). MyoD1: A Nuclear Phosphoprotein Requiring a Myc Homology Region to Convert Fibroblasts to Myoblasts. *Science*, 242, 405-411.

Thorburn, A.M., Walton, P.A., Feramisco, J.R. (1993). MyoD Induced Cell Cycle Arrest with Increased Nuclear Affinity of the Rb Protein. *Mol. Biol. Cell*, 4, 705-713.

Trouche, D., Grigoriev, M., Lenormand, J.L., Robin, P., Leibovitch, S.A., Sassone-Corsi, P., and Harel-Bellan, A. (1993). *Nature*, 363, 79-82.

Vale, R.D. und Shooter, E.M. (1985). Assaying binding of nerve growth factor to cell surface receptors. *Methods Enzymol.*, 109, 21-39.

Valera-Nieto, I., Represa, J., Avila, M.A., Miner, C., Mato, J.M., and Giraldez, F. (1991). Inositol Phospho-oligosaccharide Stimulates Cell Proliferation in the Developing Inner Ear. *Dev. Biol.*, 143, 432-435.

Verdi, J.M., Birren, S.J., Ibanez, C.F., Person, H. Kaplan, D.R., Benedetti, M., Chao, M.V., and Anderson D.J. (1994). P75^{NGFR} regulates Trk signal transduction and NGF-induced neuronal differentiation in MAH cells. *Neuron*, 12, 733-745.

von Bartheld, C.S., Patterson, L.S., Heuer, J.G., Wheeler, E.F., Bothwell, M., and Rubel, E.W. (1991). Expression of the nerve growth factor (NGF) receptor in the developing inner ear of chick and rat. *Development*, 113, 455-470.

Webster, K.A., Muscat, G.E., and Kedes, L., (1989). Adenovirus E1a products suppress myogenic differentiation and inhibit transcription from muscle-specific promoters. *Nature*, 332, 553-557.

Weintraub, H., Davis, R., Lockshon, D., and Lassar, A. (1990). MyoD binds cooperatively to two sites in a target enhancer sequence: Occupancy of two sites is required for activation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, *87*, 5623-5627.

Weintraub, H., Dwarki, V.J., Verma, I., Davis, R., Hollenberg, S., Snider, L., Lassar, A., and Tapscott, S.J. (1991). Muscle-specific transcriptional activation by MyoD. *Genes&Development*, *5*, 1377-1386.

Weintraub, H. (1993). The MyoD Family and Myogenesis: Redundancy, Networks, and Thresholds. *Cell*, *75*, 1241-1244.

Wheeler, E.F. and Bothwell, M. (1992). Spatiotemporal Patterns of Expression of NGF and the Low-Affinity NGF Receptor in Rat Embryos Suggest Functional Roles in Tissue Morphogenesis and Myogenesis. *J. Neurosci.*, *12*, 930-945.

Winter, B., Braun, T., Arnold, D., Arnold, H.H. (1992). Functional domains in the muscle-specific transcription factor Myf5. *Raven Press Series on Molecular and cellular Biology*, Vol. 2, Neuromuscular development and disease (A.M. Kelly and H.M. Blau, eds.), 45-58.

Wrobel, K.H., Bickell, D., Schimmel, M., Kujat, R. (1996). Immunohistochemical demonstration of nerve growth factor receptor in bovine testis. *Cell&Tissue Research*, *285*, 189-197.

Wyatt, S., and Davies, A.M. (1993). Regulation of expression of mRNA encoding the nerve growth factor receptors p75 and TrkA in developing sensory neurons. *Development* *119*, 635-648.

Yaffe, D. (1968). Retention of differentiation potentialities during prolonged cultivation of myogenic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, *61*, 477-483.

Yaffe, D., and Saxel, O. (1977). Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature*, 270,725-727.

Yagami-Hiromasa, T., Sato, T., Kurisaki, T., Kamijo, K., Nabeshima, Y., Fujisawa-Sehara, A. (1995). A metalloprotease-disintegrin participating in myoblast fusion. *Nature*,377,652-656.

Yan, H. and Chao, M.V. (1991). Disruption of cysteine-rich repeats of the p75 nerve growth factor receptor leads to loss of ligand binding. *J. Biol. Chem.*, 266,12099-12104.

Yuan, W., Condorelli, G., Caruso, M., Felsani, A., and Giordano, A. (1996). Human p300 Protein Is a Coactivator for the Transcription Factor MyoD. *J. Biol. Chem.*, 271, 9009-9013.

8 Index

- β -Aktin Reportergen 85
- β -Östradiol 68
- β -Östradiol-Rezeptors 66
- 15/500 Myogenin-CAT 68
- Adenovirus E1A Protein 59
- A-Spermatogonien 54
- autocrine NGF / NGF-Rezeptor 34
- Autoradiographie 63
- basische Region 80
- bHLH Transkriptionsfaktoren 62
- CD40 5
- Ceramid 8
- c-fos 8
- Collagenase 48
- Desmin 41
- Dorsalwurzelganglien 7
- E12 76
- E1A Mutante 90
- E2A 76
- E-Box 76
- Expressionsmuster 6
- Fas 5
- FGF-2 54
- FGF-Rezeptors 1 54
- G1-Phase 54
- G418 Selektion 34
- Genfamilie 5
- glycosyl-phosphatidylinositol 8
- Grad des Differenzierungszustandes 39
- HLH- Domäne 80
- Hybridprotein 66
- Immunfluoreszenzmakierung 38
- Intermediärfilamentprotein 41
- I-Spermatogonien 54
- Klon1 39
- Klon2 39
- Knockout 7
- Konservierung 5
- MADS-Box 83
- Mäusesarkoms-180 3
- MCK4R-CAT 78
- ME1 64
- MEF-2A 84
- MEF-2-Proteine 83
- MEF-CAT 84
- Melanoma Zelllinie 48
- mesenchymalen 11
- Metalloproteinasen 48
- MHC-positive Zellen 43
- MMP3 48
- MRF 76
- Mutationen 78
- Myf5-ER- 66
- Myf5-VP16 69
- Myoblasten 11
- Myoblasten-Zielgen 73
- MyoD Expression 46
- MyoD1 11
- MyoD-Effekt 66
- MyoD-ER 66
- MyoD-Mutanten 78
- MyoD-VP16 69
- myogenen bHLH Transkriptionsfaktoren 44
- Myogenin 46
- Neuronen 3
- Neurotrophine 4
- NGF 3
- NGF internalisiert 8
- p75^{NGFR}
 - Nerve Growth Factor Receptor 18
- p75NGFR-Anti-Sinn-RNA 34
- PC12 60
- Pheochromozytoma Zelllinie PC12 3
- prädifferentiiert 59
- Promotor 62
- Promotoranalyse 75
- Promotrfragmenten 73
- Proteinase-Sezernierung 49
- Purin-Analogon sensitive Protein-Kinase 8
- Ras/Raf Signalweg 8
- Regulatorischelemente 62
- Rindertestis 54
- Selektionsdruck 5
- Sequenzvergleich 5
- Signalübertragung 8
- Sphingomyelin Zyklus 8
- Stammzellen 7
- Startcodon 62
- Stromelysin 48
- TNF-Rezeptor 8
- Transin1 48
- TrkA-Rezeptor 4

VP16 68

Wachstum 2; 40

Wachstumsfaktoren 2

Wachstumsfaktor-Rezeptoren 2

Wassermolchembryonen 11

Wurzelganlien 3

Zelldichte 57

Zelldifferenzierung 2

Zell-Zellkontakt 40

Zellzyklus 54

Zymographien 48

